

新規過活動膀胱治療薬を指向した選択的アドレナリン 1D拮抗薬の創製

著者	坂内 信貴
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9393号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00129264

新規過活動膀胱治療薬を指向した
選択的アドレナリン α_{1D} 拮抗薬の創製

坂内 信貴

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Discovery of 5-Chloro-1-(5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (TAK-259), as a Novel, Selective, and Orally Active α_{1D} Adrenoceptor Antagonist with Antiurinary Frequency Effects: Reducing Human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG) Liabilities. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 2989-3002.
2. Identification of 3,4-dihydro-2H-thiochromene 1,1-dioxide derivatives with a phenoxyethylamine group as highly potent and selective α_{1D} adrenoceptor antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 139, 114-127.
3. Structure determination, synthesis, and biological evaluation of a metabolite of the selective α_{1D} adrenoceptor antagonist TAK-259. *Tetrahedron* **2016**, 72, 6334-6339.

目次

略号表

第一章 序論

第一節 過活動膀胱とその治療薬	1
第二節 アドレナリン α_1 受容体の分類と機能	3
第三節 アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬の現状と課題	6
第四節 創薬化学研究の流れ	7
第五節 hERG チャネル阻害について	8
第六節 カチオン性両親媒性薬物 (cationic amphiphilic drugs, CAD)	9
第七節 脂溶性効率 (Ligand lipophilicity efficiency, LLE)	10
第八節 医薬品の代謝物合成	10
第九節 研究方針およびその概要	11
参考文献	16

本論

第二章 イミノピリジン系化合物 5-クロロ-1-[5-クロロ-2-(メチルスルホニル)ベンジル]-2-イミノ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボキサミド **5u** (TAK-259) の創製

第一節 ヒット化合物からの合成戦略の立案	23
第二節 薬効薬理の評価	24
第三節 イミノピリジン誘導体の合成	24
第四節 イミノピリジン誘導体の初期構造活性相関	29
第五節 3-クロロベンジル誘導体 5m の hERG 阻害作用の回避	32
第六節 サブタイプ選択性、薬物動態および薬理評価	39
第七節 まとめ	41
実験項	42
参考文献	81

第三章 新規フェノキシエチルアミン系化合物の創出

第一節 既存の α_1 受容体拮抗薬を元にした合成戦略の立案	83
---------------------------------------	----

第二節	フェノキシエチルアミン誘導体の合成	86
第三節	フェノキシエチルアミン誘導体 25 の活性およびサブタイプ選択性 に必要な部分構造の同定	93
第四節	活性コンフォメーションに関する考察	98
第五節	高活性および高選択的なフェノキシエチルアミンの創出	99
第六節	まとめ	102
実験項		103
参考文献		129
第四章	TAK-259 代謝物の単離、構造決定および合成法の最適化	
第一節	TAK-259 代謝物の単離と構造決定	130
第二節	合成法の確立	132
第三節	反応条件の最適化	135
第四節	生物評価	141
第五節	まとめ	142
実験項		144
参考文献		153
総括		154
謝辞		156

略号表

AcOH	acetic acid
AcOEt	ethyl acetate
ADME-Tox	absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology
AIBN	2,2'-azobis(isobutyronitrile)
AR	adrenoceptor
AUC	area under the curve
BH ₃	borane
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl bicarbonate
BOO	bladder outlet obstruction
BPH	benign prostatic hyperplasia
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
<i>t</i> -BuXphos	2-di- <i>tert</i> -butylphosphino-2',4',6'-tri-isopropyl-1,1'-biphenyl
CAD	cationic amphiphilic drugs
CH ₃ CN	acetonitrile
C _{max}	maximum drug concentration
(COCl) ₂	oxalyl chloride
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
dba	dibenzylideneacetone
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPA	diphenylphosphoryl azide
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
Et	ethyl
Et ₃ N	triethylamine
EtOH	ethanol
F	bioavailability
HCl	hydrochloric acid
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄	sulfuric acid
5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)
HTS	high throughput screening

IC ₅₀	50% inhibitory concentration
iv	intravenous
K ₂ CO ₃	potassium carbonate
LLE	ligand lipophilicity efficiency
Me	methyl
MeOH	methanol
MeONH ₂	methoxyamine
MRT	mean residence time
NaOMe	sodium methoxide
NaSMe	sodium thiomethoxide
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
NVC	non-voiding bladder contraction
Pd/C	palladium on carbon
Pd ₂ dba ₃	tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)
Pd(OAc) ₂	palladium(II) acetate
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
POC	proof of concept
Pr	propyl
<i>i</i> -Pr ₂ NEt	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
<i>i</i> Pr ₂ O	diisopropyl ether
rt	room temperature
THF	tetrahydrofuran
V _{dss}	volume of distribution at steady state
WSC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
Xantphos	4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene
Xphos	2-(dicyclohexylphosphino)-2',4',6'-tri-isopropyl-1,10-biphenyl
Zn(CN) ₂	zinc cyanide

第一章 序論

第一節 過活動膀胱とその治療薬

過活動膀胱（overactive bladder: OAB）とは、「尿意切迫感を有し、通常頻尿・夜間頻尿を伴い尿失禁の有無を問わない」と、2002 年国際禁制学会において定義された症状疾患である¹⁾。通常の状態に比べて制御できない膀胱収縮が生じ、膀胱容量が減少すると考えられている。日本排尿機能学会において、OAB の患者数は加齢にともなって増加し、日米欧の 40 歳以上での罹患率は一割以上と報告されている²⁾。原因としては、脳と膀胱を結ぶ神経のトラブルにより起こる「神経因性」のものとそれ以外による「非神経因性」の 2 つに分類される。神経因性は脳卒中や脳梗塞などの脳血管障害、パーキンソン病などの脳の障害、脊髄損傷や多発性硬化症などの脊髄の障害の後遺症により、脳と膀胱の筋肉を結ぶ神経の回路に障害が起きる。その結果、排尿時に必要な信号伝達が正常に機能せず、膀胱に尿が少量しか貯留されていない状態においても尿意が刺激される。また、「収縮」、「弛緩」の連携が正常に機能しないなど、過活動膀胱の症状が引き起こされると考えられている。一方、非神経因性は、男性特有の疾患である前立腺肥大症患者にみられる排尿障害が原因となり、排尿時に膀胱への負担が増大することにより膀胱筋に負担がかかり、わずかな刺激でも過剰に反応して過活動膀胱を発症するといわれている。女性の場合は、出産や加齢により膀胱周辺を支えている骨盤底筋が損傷または衰弱することにより、排尿機能が低下し過活動膀胱を引き起こすと考えられている。

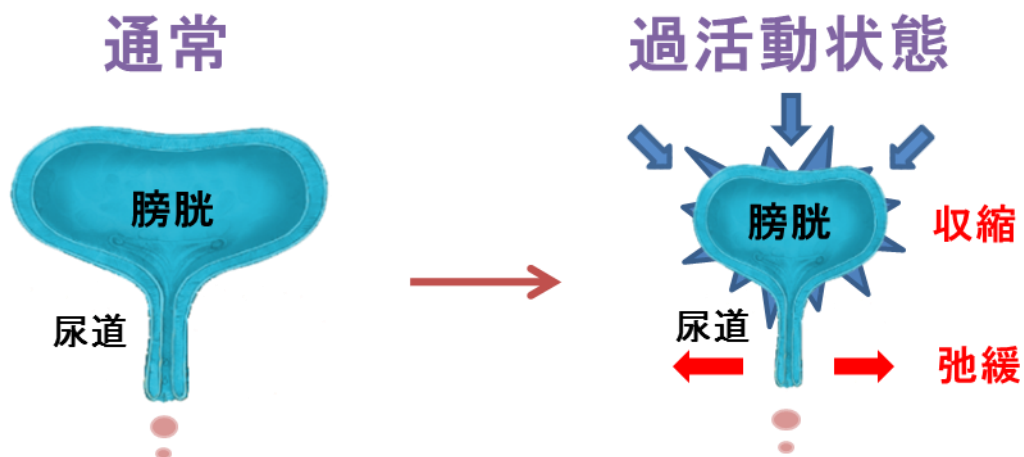


Figure 1. 過活動膀胱の状態

OAB 治療薬として広く用いられているのは、塩酸プロピペリン、塩酸オキシブチニン、トルテロジンやソリフェナシンなどの抗コリン薬である。抗コリン薬は、膀胱のムスカリン受容体と結合し、アセチルコリンの神経伝達を阻害することにより排尿筋の収縮を抑制する。ムスカリン受容体は膀胱以外の組織にも存在しているため、口渇や便秘などの副作用を引き起こすことが報告されている (Figure 2)^{3), 4)}。一方、近年開発されたアドレナリン β_3 受容体作動薬であるミラベグロンは、抗コリン薬に見られる副作用はなく、尿意切迫感や頻尿などの症状に対しても同等の効果が示されている。しかし、動物試験において精巣や子宮の重量低下や萎縮が認められており生殖可能な年齢層への投与は避けられている⁵⁾。また、男性の場合、前立腺や尿道の平滑筋を弛緩させることにより尿道抵抗を低下させ排尿症状を改善させるアドレナリン α_1 受容体拮抗薬が用いられる場合がある。本薬剤は、男性特有の疾患である前立腺肥大症によって尿道が圧迫されて過活動膀胱を引き起こした患者に対して用いられる。アドレナリン α_1 受容体拮抗薬の副作用としては、起立性低血圧、めまいや下痢などがみられることがある。上述したようにいくつかの治療薬は上市されているものの副作用や投与制限などがある。

さらに過活動膀胱は様々な原因で引き起こされるため、作用機序の異なる多くの治療薬を選択できることが望ましいが十分とはいえない。したがって、OAB 治療薬に対するアンメットメディカルニーズは依然高く新規な作用機序を持つ治療薬が望まれている⁶⁾。

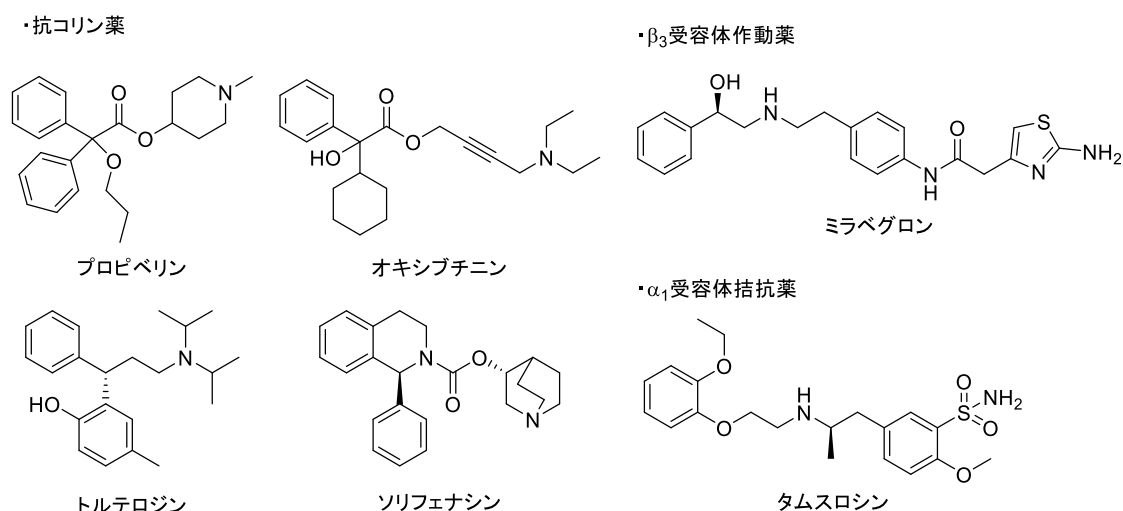


Figure 2. 市販の OAB 治療薬

第二節 アドレナリン α_1 受容体の分類と機能

アドレナリン α_1 受容体は、7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)であり、血管平滑筋、下部尿路や交感神経など多くの組織に広く分布している。さらに高血圧、心臓肥大や排尿障害を含む様々な疾患と関連性が高いことが報告されており、30 年以上にわたり学術的研究及び創薬研究が活発に行われている。 α_1 受容体は 3 つの異なるサブタイプ α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} に分類され、それぞれの分布と機能は異なることが報告されている⁷⁾。 α_{1A} 受容体は主に肝臓、膀胱頸部、前立腺や尿道に分布しており、ヒト前立腺及び尿道平滑筋の収縮を司っている。 α_{1B} 受容体は主に血管平滑筋に広く分布しており、大動脈の血管収縮を制御している^{8),9)}。 α_{1D} 受容体は主に仙髄の

副交感神経核、膀胱排尿筋や心外膜冠状動脈に発現しており、下部尿路機能を調節している¹⁰⁾。

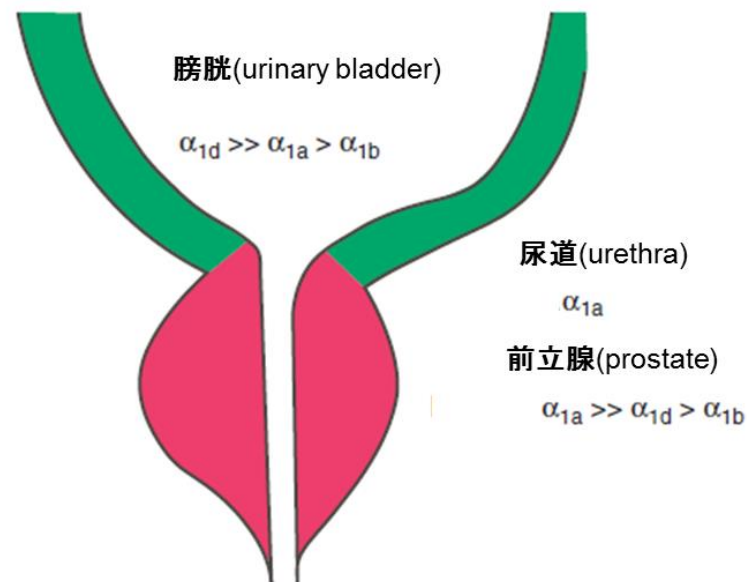


Figure 3. 下部尿路におけるアドレナリン受容体の遺伝子分布図¹¹⁾

各サブタイプの機能については、それぞれ動物モデルを用いた薬理試験により解明されつつある。 α_{1A} 受容体では、尿道平滑筋の収縮を調節する機能に着目し、麻酔下イヌを用いたフェニレフリン誘発尿道内圧上昇モデル対して α_{1A} 受容体拮抗薬が収縮抑制作用を示すことが報告されている¹²⁾。自然発生高血圧ラットに対して α_{1B} 受容体を拮抗することにより血圧が低下すること、 α_{1B} 受容体ノックアウトマウスではフェニレフリンにより誘発される高血圧応答が減弱することが知られている¹³⁾。また、尿道出口部閉塞ラットでは、無排尿性膀胱収縮の頻度および振幅が増大する作用に対し、 α_{1D} 受容体拮抗薬が無排尿性膀胱収縮の頻度および振幅を抑制することが知られている¹⁴⁾。また、 α_{1D} 受容体のノックアウトマウスでは野生型に比べて膀胱容量と一回排尿量が増加することが報告されている¹⁵⁾。

上述した各サブタイプの機能について、動物モデルとヒトとの間の相関関係は、以下の薬剤の薬理作用から説明できる。 α_{1A} と α_{1D} 受容体拮抗薬であるタムスロシンと、 α_{1A} 受容体に対して高い特異性を有するシロドシンは、前立腺肥大症の患者に対する排尿障害治療薬として処方されている。その主作用は、 α_{1A} 受容体を拮抗することにより前立腺および尿道の平滑筋を弛緩させ排尿を促進させることである。なお、タムスロシンは膀胱機能に対して改善作用があり、OAB 症状もある程度改善することが報告されている¹⁶⁾。非選択的 α_1 受容体拮抗薬であるウラピジルは、排尿障害と高血圧治療薬として処方されている。抗高血圧効果は、 α_{1B} 受容体を拮抗することにより血管が拡張し血圧を低下させることに起因する¹⁷⁾。また、 α_{1A} より α_{1D} 受容体への親和性が高いナフトピジルは、タムスロシンと同じく排尿障害治療薬として用いられているが、排尿症状よりも蓄尿症状に高い効果を示すことが知られている¹⁸⁾。タムスロシンの OAB 症状とナフトピジルの蓄尿症状の改善作用は、いずれも α_{1D} 受容体を遮断したことによる効果と考えられている。以上のことから、動物モデルで確認された機能と臨床情報から各サブタイプの機能は相関関係があることがわかる。

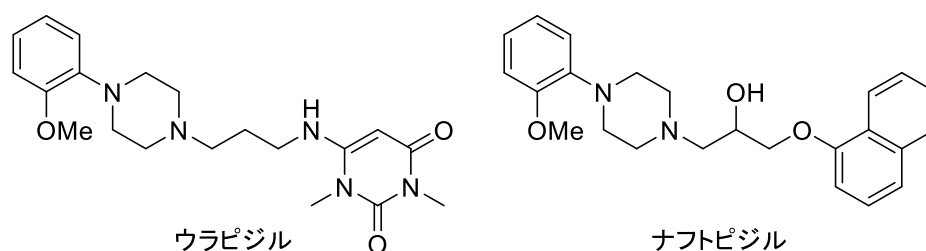


Figure 4. ウラピジルとナフトピジルの構造

α_1 受容体拮抗薬の副作用として報告されているのは、起立性低血圧（立ちくらみ、めまいやふらつき）や射精障害などである。起立性低血圧の原因に関しては、血管に存

在する α_{1B} 受容体を遮断することにより、血管拡張作用が働き起立性低血圧を引き起こすと考えられている¹⁹⁾。また、射精障害については通常射精時に α_{1A} 受容体の働きにより尿道を収縮して膀胱へ精液が流入することを防げるが、 α_{1A} 受容体を遮断したことにより尿道を閉塞する機能が失われているため、精液が膀胱内に逆流するために引き起こされると考えられている。

上述したように、 α_{1A} 受容体を拮抗することにより射精障害が生じ、 α_{1B} 受容体を拮抗すると血管拡張作用により血圧低下の副作用が生じると考えられる。一方で、 α_{1D} 受容体を拮抗したことに伴う副作用は報告例されていないことから、選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬は副作用の少ない OAB 治療薬になりうると期待できる。

第三節 アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬の現状と課題

アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬の代表化合物として用いられているのは、フェニルピペラジン構造を主骨格とする BMY 7378 である。しかし、BMY 7378 は当初抗不安薬をターゲットとしたセロトニン 1A (5-HT_{1A}) 作動薬として開発されており、 5-HT_{1A} に対して強い親和性を示すことが報告されている²⁰⁾。 5-HT_{1A} に対する親和性を大幅に低減した SNAP8719 が報告されているものの、臨床試験に至っていない²¹⁾。また、別の主骨格を有するフェノキシエチルアミン誘導体 **A** が報告されているものの、ラットの組織を用いた機能性試験では α_{1B} に対するサブタイプ選択性は約 10 倍と低かった。さらに、ヒトの組織を用いた親和性試験においても α_{1A} と α_{1B} のサブタイプに対する選択性がそれぞれ 1.1 倍、10 倍と BMY 7378 や SNAP8719 に比べて低く、改善の余地があった²²⁾。以上のように、 α_{1D} 選択的な拮抗薬は未だ開発されておらず、その有効性と副作用を評価した例はない。したがって、 5-HT_{1A} および α_{1A} と α_{1B} のサブタイプに対して高選

択的な α_{1D} 受容体拮抗薬を創出し、in vivo での薬理作用を確認することは創薬研究において非常に価値の高いことである (Figure 5)。

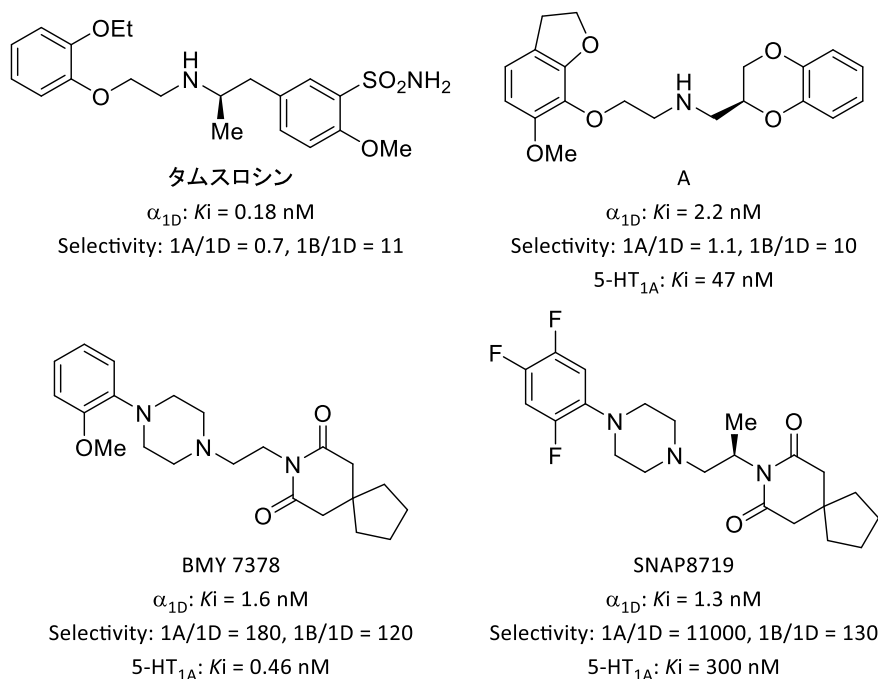


Figure 5. Structure and biological activity of reported α_{1D} -ARs antagonists.

第四節 創薬化学研究の流れ

創薬研究ではまず標的タンパクを選定し、そのターゲットに対して活性を示す化合物を見出す。標的タンパクに対する活性化合物を探索するにあたり用いられる方法は、内因性リガンドからのデザイン、文献および特許情報を元にした化合物デザイン、ランダムスクリーニング法などがある。本論ではランダムスクリーニング法の一つであるハイスループットスクリーニング (high throughput screening, HTS) と文献および特許情報を元にした化合物デザインにより研究を進めた。ランダムスクリーニング法は、今までに報告された薬物とは全く異なった骨格を含んだ多種多様な化合物群を網羅的に評価

する方法であることから、新規性の高いヒット化合物を見出せることが期待できる。一方、文献および特許情報を元にした化合物デザインを用いる場合、高活性化合物をリードとするためランダムスクリーニング法の化合物に比べて早期に活性または薬効を有する化合物が見出されることが期待される。また、既知化合物が示す薬物動態や安全性などの情報から、デザインした化合物の持続性や安全性などを予想することも可能である。これら種々の手法を用いて得られたヒット化合物の構造変換により見出された有望なリード化合物群（ケモタイプ）に対して最適化を行い、毒性評価、代謝物解析やヒト動態予測など医薬品として優れたプロファイルを有する臨床候補化合物へと導いていく。

第五節 hERG チャンネル阻害について

hERG (human ether-a-go-go related gene) チャンネルとは、ヒト心臓の心筋に発現している心筋活動電位の再分極を担うカリウムイオンチャンネルである。このイオンチャンネルを薬物により阻害すると心筋細胞のカリウムチャンネルが抑制され、心筋細胞の活動電位が延長することにより QT 間隔の延長が引き起こされ、不整脈などの重篤な副作用を生じることが知られている (Figure 6) ²³⁾。そのため、hERG チャンネルの阻害を回避することは、副作用のリスクを下げるために必要不可欠である。hERG チャンネル阻害を回避するためのアプローチは、これまでにいくつかの方法が報告されている ²⁴⁾。一般的な回避手法としては、脂溶性を低減すること、塩基性アミンを中性または酸性基へ変換すること（カチオン性両親媒性薬物 (cationic amphiphilic drugs, CAD) 構造の回避）、双極性イオン化することなどにより薬物の hERG チャンネルとの親和性を低下させる方法などが知られている。さらに、最近ではドッキングモデルを用いて hERG チャンネルと薬物との結合部位を予測し、変換部位を特定して効率的に結合回避を図る手法もとられている ²⁴⁾。

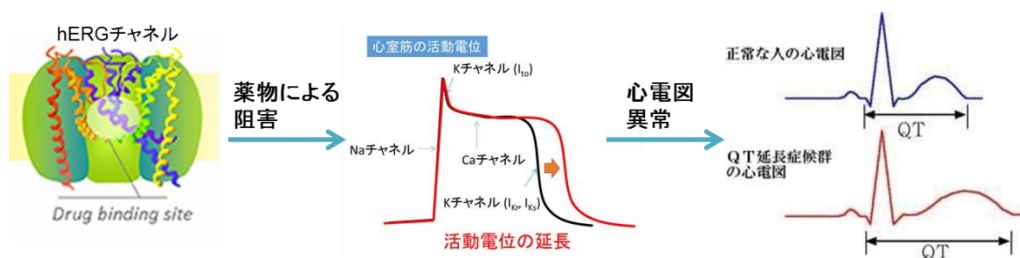


Figure 6. hERG チャンネル阻害剤の心臓への影響

第六節 カチオン性両親媒性薬物 (cationic amphiphilic drugs, CAD)

カチオン性両親媒性薬物は、Figure 7 に示した脂肪族第二級または第三級アミンと芳香環により構成される疎水性構造を有する薬物の総称である。このような構造を有する化合物は、ホスホリピドーシスの誘発、hERG 阻害や CYP 阻害を示す可能性が高いことが知られている²⁵⁾。一方で、両親媒性の特徴を持つ薬剤は膜透過性を高め、疎水性部位が細胞内の受容体と相互作用するのに好ましい構造である。したがって、中枢薬など多くの市販の薬剤において CAD (cationic amphiphilic drugs) 構造を有しており、ドラックライクネスが高い化学構造とも考えられる。

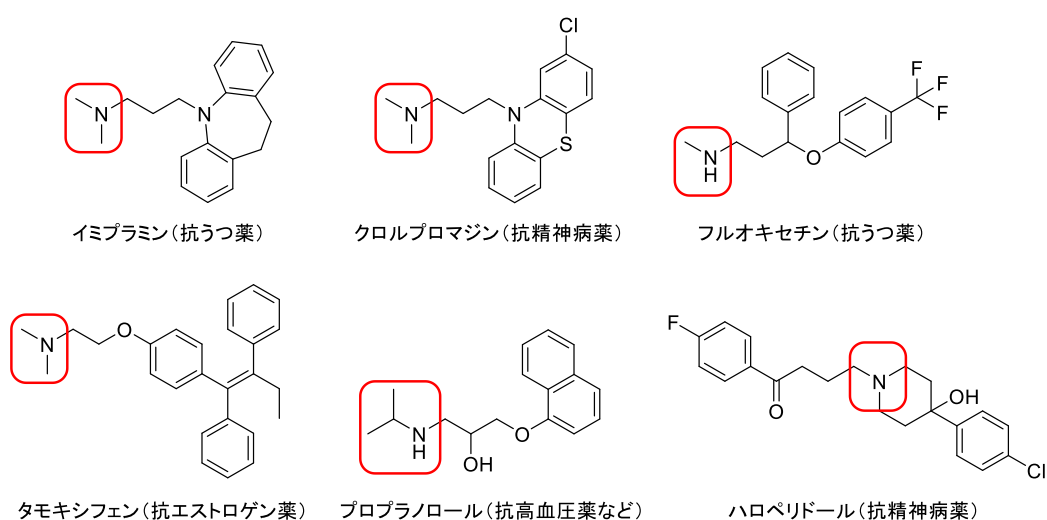


Figure 7. CAD 構造を有する代表的な薬剤の化学構造

第七節 脂溶性効率 (Ligand lipophilicity efficiency, LLE)

脂溶性効率 (Ligand lipophilicity efficiency, LLE) は、下式に示した生物活性と脂溶性の双方を内包する指標である。生物活性が同等の化合物を比較した場合、脂溶性の値が低い化合物は LLE の値は増大し、脂溶性の高い化合物は LLE の値が低下する。

$$\text{LLE} = \text{LipE} = \text{pIC}_{50} \text{ (or pKi)} - \text{clogP (or logD)}$$

創薬研究において化合物の脂溶性を増大させることは活性を向上させる場合も多く見られるが、同時に代謝安定性の低下、CYP 阻害作用の増大、hERG 阻害作用の増強など ADME プロファイルや安全性に悪影響を及ぼすことが懸念される²⁶⁾。したがって、創薬研究の初期段階から脂溶性と活性のバランスをとった最適化検討を行うことにより、副作用の危険性や薬物動態の低下を伴うことなく臨床候補化合物を創出する可能性を高めることができる。上市されている薬剤の LLE の平均値はおおよそ 6 であり、これ以上の数値が望ましいと報告されている²⁷⁾。すなわち、LLE の値が 6 以下の場合、上述した ADME プロファイルの低下や安全性に問題が生じる可能性が高くなる。近年報告されている論文においても LLE を指標とした最適化研究の例は多く報告されており、臨床候補化合物を見出すにあたり重要なパラメーターとして用いられている²⁷⁾。

第八節 医薬品の代謝物合成

医薬品は体内に取り込まれた後、肝臓を始めとする種々の組織において複数の代謝酵素により代謝される。代謝物は通常水溶性が増し、体外へ排出されやすい形へと変換される。その代謝物は毒性の低減された安全な物質へと変換されることが多いものの、一部の医薬品の代謝物が毒性を示し、副作用を引き起こすことが明らかになっている²⁹⁾。

また、多くの薬物は代謝されると主活性を失うが、代謝物が主活性を失わず原体に比べより強い活性を有する場合があります、有効用量の設定などヒトの薬物動態を予測する上で大きな問題となる。このような背景から、米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）は、医薬品代謝物の安全性に関するガイダンスを出し、医薬品開発において基礎研究段階から代謝物の安全性試験を実施する必要性を促した³⁰⁾。医薬品の代謝物に関する安全性を確認するため、単離・構造決定およびその合成は、医薬品開発において非常に重要な役割がある。

医薬品代謝物の調製は、薬剤を投与した動物の胆汁や尿からの代謝物の単離、肝ミクロソームなどの粗酵素画分を用いた生合成法および有機合成などが知られている。実験動物からの単離や酵素合成法を用いる場合、多くとも数十 mg 程度しか合成できないため、グラム単位の代謝物調製は困難である。そこで、有機合成法による調製が有用である。

第九節 研究方針およびその概要

第一章第一節から第三節で述べた研究背景から、筆者はより副作用の少ない新規な OAB 治療薬として、 α_{1D} 選択的受容体拮抗薬を見出す目的で研究を開始した。その理由として、 α_{1A} 受容体を拮抗することにより尿道平滑筋が弛緩され、逆行性射精などの副作用が生じ得ること、 α_{1B} 受容体を拮抗することにより血管や循環器への影響があり、重篤な副作用が生じる可能性があると考えたためである。新規選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬を創出するにあたり、本研究においては第一章第四節で述べた 2 つ戦略に基づいて実施した。既存の化合物とは全く異なる構造を有するライブラリの中からヒット化合物を見出すことができれば、新規性の面で大きなメリットがある。そこで、社内

化合物ライブラリの HTS からヒット化合物を見出し最適化することにより薬剤を創出することとした。次に、既存の情報からデザインすれば、 α_{1D} 受容体に対して高い活性を持つ化合物を早期に見出すことが期待できる。したがって、既存情報を元に分子設計し、薬剤の創製を試みた。

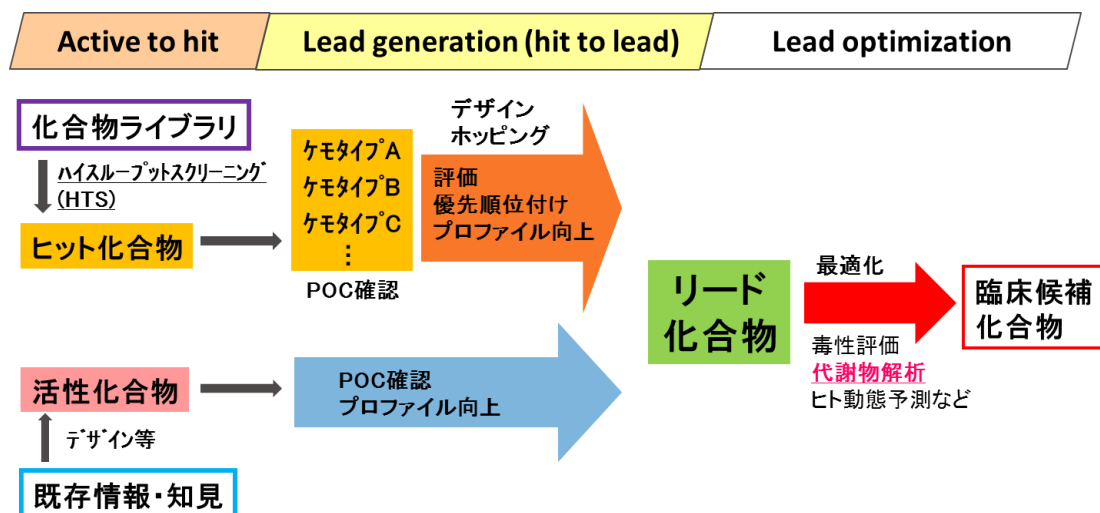


Figure 8. 本論における臨床化合物創出までの流れ

HTS を実施した結果、既存の α_1 受容体拮抗薬とは全く異なる構造を持ちサブタイプ選択性が非常に高いイミノピリジン誘導体 **1** を見出した。イミノピリジン誘導体 **1** に関して、合成法が報告されているものの、周辺類縁体に関しての合成例や薬理作用に関する報告例はない³¹⁾。そこで、合成ルートの検証と薬理作用を評価するため、詳細な SAR を取得し活性向上を目的とした合成展開を実施した。その結果、活性が向上したリード化合物 **5m** を見出すに至った。しかし、**5m** は hERG 阻害活性を示すことが明らかになったため、hERG 阻害活性の低減を目的とした合成展開を実施した。具体的には、**5m** と hERG チャネルとのドッキングモデルを構築し、分子設計を行った。その結果、hERG 阻害活性の低減に成功し、臨床候補化合物 **5u** (TAK-259) を見出すに至った。その詳細な経緯について第二章で論じる。

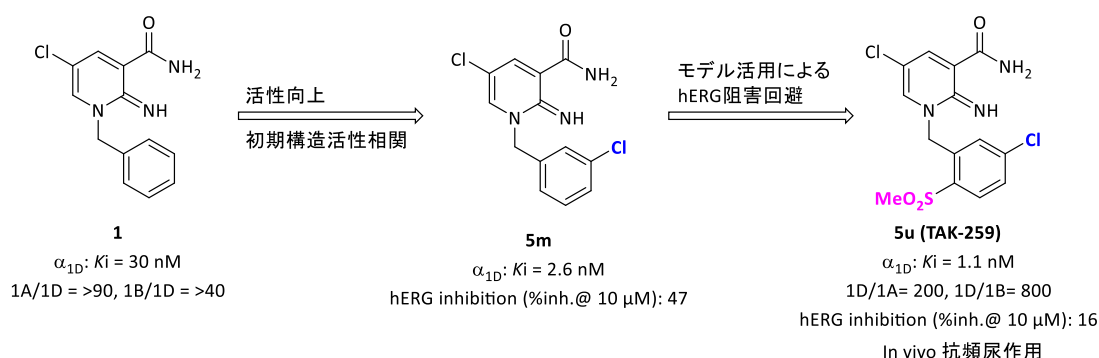


Figure 9. 第二章の研究方針と概要

一方、排尿障害治療薬として上市されているタムスロシンと第一章第三節で述べた化合物 **A** の共通構造を元にした分子設計を行うことにより、 α_{1A} と α_{1B} に対するサブタイプ選択性が高いフェノキシエチルアミン誘導体(**S**)-**59**を創出した過程について第三章で述べる。 α_1 受容体に対して非常に高い活性を有するタムスロシンや、化合物 **A** がもつフェノキシエチルアミン構造は、 α_1 受容体拮抗薬として多く報告例があることから、 α_1 受容体に対して高い活性を持つと期待した。そこで、フェノキシエチルアミン構造を持つ化合物について社内ライブラリを探索した結果、サブタイプ選択性の高いフェノキシエチルアミン誘導体 **25** を見出した。そこで、化合物 **25** のサブタイプ選択性を保持しつつ活性向上を指向した合成展開を実施した結果、活性が向上した化合物 **40b** を見出すことに成功した。しかし、化合物 **40b** は CYP3A4 阻害率が高く、ヒト代謝安定性が低いことから改善する必要があるため、LLE を指標とした更なる構造最適化検討を実施した。その結果、第二章で最適化合物として見出した化合物 **5u** とほぼ同等の選択性および活性を有する化合物(**S**)-**59** を創出した。

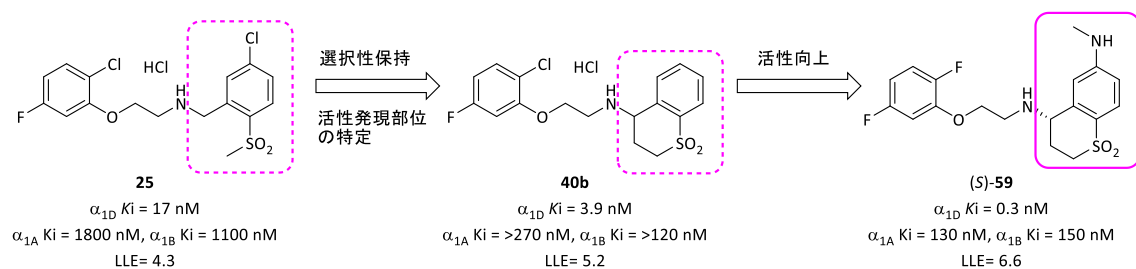


Figure 10. 第三章の研究方針と概要

以上、二つのアプローチを効果的に活用し、両方のアプローチから有望な化合物を見出した。見出した化合物 **5u** と (S)-**59** を比較して、ADMET プロファイルに優れ、in vivo 試験においても良好な抗頻尿効果を示した化合物 **5u** を選択し、開発コード名 TAK-259 として臨床段階へと移行するため各種精査試験を行った。その過程で、大動物のサルでの安全性試験を行う際に実施した薬物動態試験において、代謝物 **61** が確認された。そこで、化合物 **5u** の代謝物 **61** の単離・構造決定を行い、その効率的な合成ルートを確立した経緯について第四章で述べる。代謝物構造を解析するため推定代謝物の合成ルートと排泄経路の検証を実施した結果、その構造はイミノピリジン環上の水素原子が水酸化された化合物と予想した。導入可能な水酸化体全てを合成することは困難と考え、サルの尿から直接抽出・精製を試みることにした。その結果、単離・構造決定に成功し、代謝物は **61a** に示した構造であることを明らかにした。代謝物 **61a** を毒性試験するにあたり十分な量を確保するために合成ルートの探索を行い、効率的に目的物を得るルートを確立した。

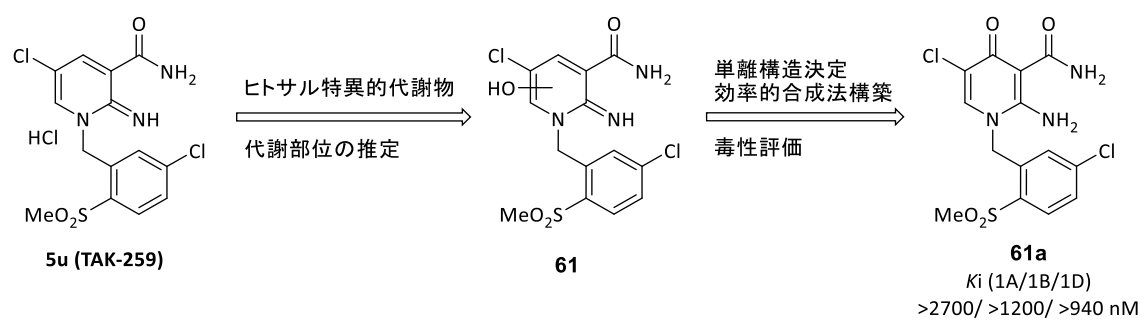


Figure 11. 第四章の研究方針と概要

References

- (1) Abram, P.; Cardozo, L.; Fall, M. The standardization of terminology of lower urinary tract function: Report from the standardization subcommittee of the international continence society. *Neurourol. Urodyn.* **2002**, *21*, 167-178.
- (2) (a) Milsom, I.; Abram, P.; Cardozo, L.; Roberts, R. G.; Thuroff, J.; Wein, A. J. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int.* **2001**, *87*, 760-766. (b) Stewart, W. F.; Wein, A. J. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World. J. Urol.* **2003**, *20*, 327-336. (c) Homma, Y.; Yamaguchi, O.; Hayashi, K. An epidemiological survey of overactive bladder symptoms in Japan. *BJU Int.* **2005**, *96*, 1314-1318.
- (3) Haab, F.; Castro-Diaz, D. Persistence with antimuscarinic therapy in patients with overactive bladder. *Int. J. Clin. Pract.* **2005**, *59*, 931-937.
- (4) (a) Gopal M, Haynes K, Bellamy SL: Discontinuation rates of anticholinergic medications used for the treatment of lower urinary tract symptoms. *Obstet. Gynecol.* **2008**, *112*, 1311-1318. (b) Schwinn, D.A. and C.G. Roehrborn: Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int. J. Urol.* **2008**, *15*(3), 193-199.
- (5) Martin, C. M. and Stavros G. Safety and tolerability of β_3 -adrenoceptor agonists in the treatment of overactive bladder syndrome – insight from transcriptome and experimental studies. *Expert Opin. Drug Saf.* **2016**, *15*, 647–657.
- (6) (a) Andersson, K. E.; Appell, R.; Cardozo, L. D.; Chapple, C.; Drutz, H. P.; Finkbeiner, A. E.; Haab, F.; Vela Navarrete, R. The pharmacological treatment of urinary incontinence. *BJU Int.* **1999**, *84*, 923-947. (b) Howe, B. B.; Halterman, T. J.; Yochim, C. L.; Do, M. L.; Pettinger, S. J.; Stow, R. B.; Ohnmacht, C. J.; Russell, K.; Empfield, J. R.; Trainor, D. A.; Brown, F. J.; Kau, S. T. ZENCAZD6169: A novel KATP channel opener with in vivo

- selectivity for urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 274, 884-890. (c) Masuda, N.; Uchida, W.; Shirai, Y.; Shibasaki, K.; Goto, K.; Takenaka, T. Effect of the potassium channel opener YM934 on the contractile response to electrical field stimulation in pig detrusor smooth muscle. *J. Urol.* **1995**, 154, 1914-1920. (d) Pitsikas, N. Duloxetine Eli Lilly & Co. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2000**, 1, 116-121.
- (7) Hancock, A. A. α_1 -Adrenoceptor subtypes: a synopsis of their pharmacology and molecular biology. *Drug Dev. Res.* **1996**, 39, 54-107.
- (8) (a) Forray, C.; Bard, J. A.; Wetzel, J. M.; Chiu, G.; Shapiro, E.; Tang, R.; Lepor, H.; Hartig, P.R.; Weinshank, R.L.; Branchek, T.A.; Gluchowski, C. The α_1 -adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human α_{1c} subtype. *Mol. Pharmacol.* **1994**, 45, 703-708. (b) Marshall, I.; Burt, R. P.; Chapple, C. R. Noradrenaline contractions of human prostate mediated by α_{1A} -(α_{1c} -)adrenoceptor subtype. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, 115, 781-786. (c) Moriyama, N.; Kurimoto, S.; Horie, S.; Nasu, K.; Tanaka, T.; Yano, K.; Hirano, H.; Tsujimoto, G.; Kawabe, K. Detection of alpha 1-adrenoceptor subtypes in human hypertrophied prostate by in situ hybridization. *Histochem. J.* **1996**, 28, 283-288. (d) Nasu, K.; Moriyama, N.; Kawabe, K.; Tsujimoto, G.; Murai, M.; Tanaka, T.; Yano, J. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human prostate: comparison of benign hypertrophied tissue and non-hypertrophied tissue. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, 119, 797-803.
- (9) (a) Hatano, A.; Takahashi, H.; Tamaki, M.; Komeyama, T.; Koizumi, T.; Takeda M. Pharmacological evidence of distinct α_1 -adrenoceptor subtypes mediating the contraction of human prostatic urethra and peripheral artery. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, 113, 723-728. (b) Hancock, A.A. α_1 -Adrenoceptor subtypes: a synopsis of their pharmacology and molecular biology. *Drug Dev. Res.* **1996**, 39, 54-107.

- (10) (a) Michelotti, G. A.; Price, D. T.; Schwinn, D. A. Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* **2000**, 88, 281–309. (b) Malloy, B. J.; Price, D. T.; Price, R. R.; Bienstock, A. M.; Dole, M. K.; Funk, B. L.; Rudner, X. L.; Richardson, C. D.; Donatucci, C. F.; Schwinn, D. A. Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human bladder detrusor. *J. Urol.* **1998**, 160, 937–943. (c) Schwinn, D. A.; Roehrborn, C. G. Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int. J. Urol.* **2008**, 15, 193–199.
- (11) Martin-Moro, J. G.; Negrete, F. M.; Escobar, I. L.; Miguel, Y. F. Intraoperative floppy-iris syndrome. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **2013**, 88(2), 64-76.
- (12) Kuo, G.; Prouty, C.; Murray, W. V.; Pulito, V.; Jolliffe, L.; Cheung, P.; Varga, S.; Evangelisto, M.; Shaw, C. Design, Synthesis and biological evaluation of pyridine-phenylpiperazines: A novel series of potent and selective α_{1a} -adrenergic receptor antagonist. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2263-2275.
- (13) (a) Giardiná, D.; Gulini, U.; Massi, M.; Piloni, M. G.; Pierluigi Pompei, P.; Giovanni Rafaiani, G.; Melchiorre, C. Structure-activity relationships in prazosin-related compounds. 2. Role of the piperazine ring on α -blocking activity. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 690-698. (b) Vecchione, C.; Fratta, L.; Rizzoni, D.; Notte, A.; Poulet, R.; Porteri, E.; Giacomo Frati, G.; Guelfi, D.; Trimarco, V.; Mulvany, J. M.; Agabiti-Rosei, E.; Trimarco, B.; Cotecchia, S.; Lembo, G. Cardiovascular influences of α_{1b} -adrenergic receptor defect in mice. *Circulation.* **2002**, 105, 1700-1707.
- (14) (a) Hampel, C.; Dolber, P. C.; Smith, M. P.; Savic, S. L.; Thüroff, J. W.; Thor, K. B.; Schwinn, D. A. Modulation of bladder α_1 -adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *J. Urol.* **2002**, 167, 1513-1521. (b) Velasco, C.; Guarneri, L.; Leonardi, A.; Testa, R. Effects of intravenous and infravesical administration of suramin, terazosin and

- BMV 7378 on bladder instability in conscious rats with bladder outlet obstruction. *BJU Int.* **2003**, 92, 131-136.
- (15) Chena, Q.; Takahashi, S.; Zhong, S.; Hosoda, C.; Zheng, H.; Ogushi, T.; Fujimura, T.; Ohta, N.; Tanoue, A.; Tsujimoto, G.; Kitamura, T. Function of the lower urinary tract in mice lacking alpha 1d-adrenoceptor. *J. Urol.* **2005**, 174, 370-374.
- (16) Taniguchi, K.; Nakamura, K.; Iesaka, Y.; Nitta, M.; Ito, H.; Kirigaya, H.; Takeuchi, J.; Fujiwara, H.; Iizumi, T.; Inada, M. Clinical evaluation of urapidil, a new antihypertensive drug: preliminary findings in Japan. *Clin. Ther.* **1985**, 7, 559-567.
- (17) (a) Narayan, P.; Evans, C.P.; Moon, T. Long-term safety and efficacy of tamsulosin for the treatment of lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **2003**, 170, 498-502. (b) Yamaguchi, O.; Aikawa, K.; Shishido, K.; Nomiya, M. Place of overactive bladder in male lower urinary tract symptoms. *World. J. Urol.* **2009**, 27, 723-728. (c) Kawabe, K.; Yoshida, M and Homma, Y. Silodosin, a new alpha1A-adrenoceptor-selective antagonist for treating benign prostatic hyperplasia: Results of a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study in Japanese men. *BJU Int.* **2006**, 98, 1019-1024.
- (18) (a) Ikemoto, I.; Kiyota, H.; Ohishi, Y.; Abe, K.; Goto, H.; Kishimoto, K. and Miki, K. Usefulness of tamsulosin hydrochloride and naftopidil in patients with urinary disturbances caused by benign prostatic hyperplasia: A comparative, randomized, two-drug crossover study. *Int. J. Urol.* **2003**, 10, 587-594. (b) Ukimura, O.; Kanazawa, M.; Fujihara, A.; Kamoi, K.; Okihara, K.; Miki, T. and Kyoto Prefectural University of Medicine Benign Prostatic Hypertrophy Research Group. Naftopidil versus tamsulosin hydrochloride for lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia with special reference to the

- storage symptom: A prospective randomized controlled study. *Int. J. Urol.* **2008**, *15*, 1049-1054.
- (19) (a) Roehrborn, C. G.; Schwinn, D. A. Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **2004**, *171*, 1029–1035. (b) Lepor, H.; Auerbach, S.; Puras, B. A.; Narayan, P.; Soloway, M.; Lowe, F.; Moon, T.; Leifer, G.; Madsen, P. A randomized, placebocontrolled multicenter study of the efficacy and safety of terazosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* **1992**, *148*, 1467–1474. (c) Lepor, H.; Tang, R.; Meretyk, S.; Shapiro, E. Binding and functional properties of alpha1 adrenoceptors in different regions of the human prostate. *J. Urol.* **1993**, *150*, 252–256.
- (20) Kuo, G. H.; Prouty, C.; Murray, W. V.; Pulito, V.; Jolliffe, L.; Cheung, P.; Varga, S.; Evangelisto, M. and Wang, J. Design, synthesis, and structure-activity relationships of phtalimidephenylpiperazines: A novel series of potent and selective α_{1a} -adrenergic receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2183-2195.
- (21) Michael J. K.; John M. W.; Marie C.; Douglas A. C.; Stewart A. N. and Charles G. Synthesis and structure-activity relationship of fluoro analogues of 8-{2-[4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1yl]ethyl}-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione as selective α_{1d} -adrenergic receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3076-3079.
- (22) Fumagalli, L.; Pallavicini, M.; Budriesi, R.; Bolchi, C.; Canovi, M.; Chiarini, A.; Chiodini, G.; Gobbi, M.; Laurino, P.; Micucci, M.; Straniero, V. and Valoti, E. 6-Methoxy-7-benzofuranoxy and 6-methoxy-7-indolyloxy analogues of 2-[2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethyl]aminomethyl-1,4-benzodioxane (WB4101): Discovery of a potent and selective α_{1D} -adrenoceptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6402-6412.

- (23) Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, **2006**, *440*, 463-469.
- (24) (a) Jamieson, C.; Moir, E. C.; Rankovic, Z.; Wishart, G. Medicinal chemistry of hERG optimizations: Highlights and hang-ups. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5029–5046. (b) Imai, Y. N.; Ryu, S.; Oiki, S. Docking model of drug binding to the human ether-à-go-go potassium channel guided by tandem dimer mutant patch-clamp data: A synergic approach. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1630–1638. (c) Kasai, S.; Kamata, M.; Masada, S.; Kunitomo, J.; Kamaura, M.; Okawa, T.; Takami, K.; Ogino, H.; Nakano, Y.; Ashina, S.; Watanabe, K.; Kaisho, T.; Nakayama, M.; Imai, Y. N.; Ryu, S.; Nagisa, Y.; Takekawa, S.; Kato, K.; Murata, T.; Suzuki, N. and Ishihara, Y. Synthesis, structure–activity relationship, and pharmacological studies of novel melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists 3-aminomethylquinolines: reducing human ether-ago-go-related gene (hERG)-associated liabilities. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4336–4351.
- (25) (a) Nonoyama, T.; Fukuda, R. Drug-induced phospholipidosis–pathological aspects and its prediction. *J. Toxicol. Pathol.* **2008**, *21*, 9-24. (b) Funk, R. S.; Krise, J. P. Cationic amphiphilic drugs cause a marked expansion of apparent lysosomal volume: implications for an intracellular distribution-based drug interaction. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 1384–1395.
- (26) Hopkins, A. L.; Keseru, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 105-121.
- (27) Keseru, G. M.; Makara, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 203–212.
- (28) (a) Rackham, M. D.; Brannigan, J. A.; Rangachari, K.; Meister, S.; Wilkinson, A. J.; Holder, A. A.; Leatherbarrow, R. J.; Tate, E. W. Design and synthesis of high affinity inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *plasmodium vivax* *N*-myristoyltransferases directed by ligand

- efficiency dependent lipophilicity (LELP). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2773-2788. (b) DeNinno, M. P.; Wright, S. W.; Etienne, J. B.; Olson, T. V.; Rocke, B. N.; Corbett, J. W.; Kung, D. W.; DiRico, K. J.; Andrews, K. M.; Millham, M. L.; Parker, J. C.; Esler, W.; Volkenburg, M.; Boyer, D. D.; Houseknecht, K. L.; Doran, S. D. Discovery of triazolopyrimidine-based PDE8 inhibitors: exceptionally ligand-efficient and lipophilic ligand-efficient compounds for the treatment of diabetes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5721-5726. (c) Ted, W. J.; Rebecca, A. G.; Martin, P. E. Lipophilic efficiency as an important metric in drug design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6401-6420.
- (29) Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. W. H. O.* **1999**, *77*, 754-766.
- (30) FDA, 2008, Guidance for Industry–Safety Testing of Drug Metabolites
- (31) (a) Plukse, I.; Karklina, A.; Gudriniece, E.; Liepins, E.; Petrova, M. V.; Ziemele, M. $\Delta\alpha,\beta$ -Butenolides. X. Reactions of halobutenolides with aliphatic amines. *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis, Kim. Ser.* **1985**, *3*, 351-358. (b) Yoshida M.; Suzaki T.; Kohara Y.; Kuno H.; Nagabukuro H.; Saikawa R.; Okabe Y.; Imai S. Iminopyridine derivative and use thereof. WO2008050732 A1, PCT Int. Appl. May 02, **2008**.

第二章 イミノピリジン系化合物 5-クロロ-1-[5-クロロ-2-(メチルスルホニル)ベンジル]-2-イミノ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボキサミド **5u** (TAK-259) の創製

第一節 ヒット化合物からの合成戦略の立案

自社化合物ライブラリを用いて HTS を実施し、 α_{1D} 受容体発現細胞を用いた結合親和性と、 α_{1A} および α_{1B} 受容体とのサブタイプ選択性について評価した結果、筆者らは α_{1D} 受容体に対して高いサブタイプ選択性を示すイミノピリジン系化合物 **1** を見出した (α_{1D} $K_i = 30$ nM)。第一章第八節で述べたように、化合物 **1** の合成法は報告されているものの類縁体へ誘導化した例や薬理作用に関する情報はなため、詳細な SAR を取得する必要があった。そこで、Figure 11 に示した R^1 から R^4 は合成上変換可能であると考え、種々の誘導体を合成し、活性発現部位の特定を行うことにより優れたリード化合物へ展開することとした。

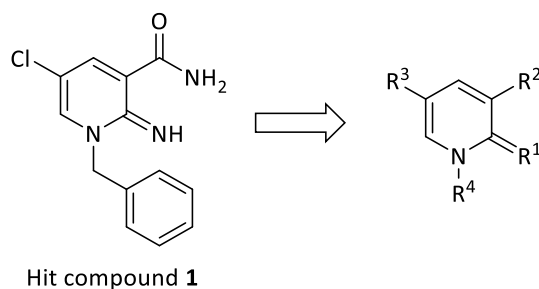


Figure 12. ヒット化合物 **1** の変換可能部位

第二節 薬効薬理の評価

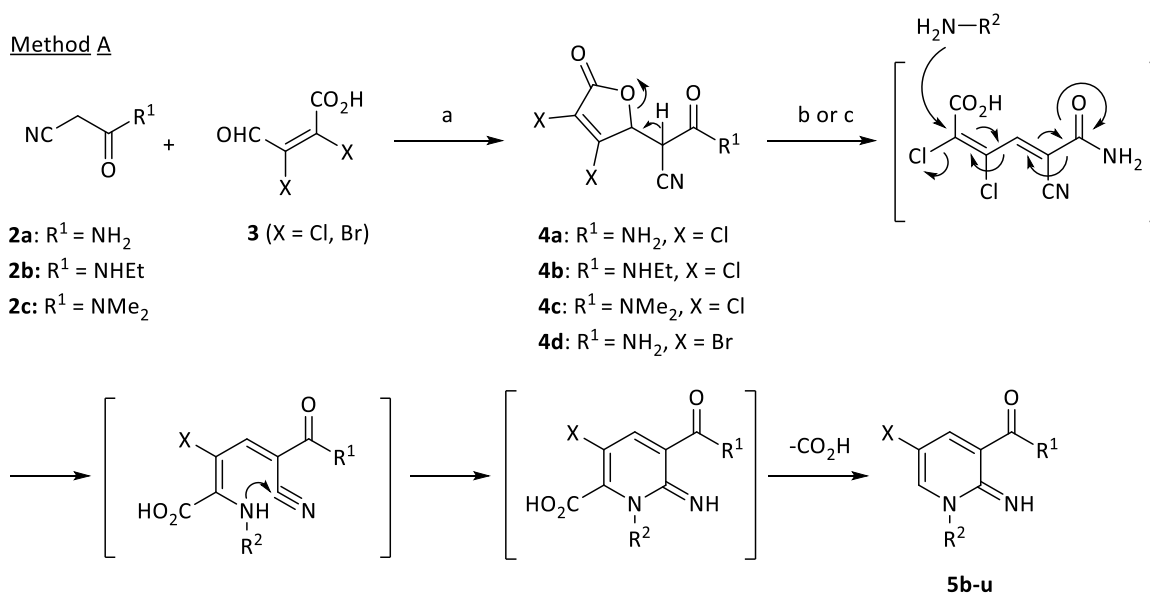
化合物の α_1 受容体に対する *in vitro* 親和性は、組換えヒト α_{1A} 、 α_{1B} および α_{1D} 受容体発現 CHO-K1 細胞膜画分に対する [3 H]-prazosin の結合阻害試験により評価した。*in vitro* 機能性試験では、膀胱出口部閉塞 (bladder outlet obstruction: BOO) ラットの摘出膀胱筋におけるフェニレフリン誘発収縮に対する抑制作用を評価し、 IC_{30} 値として示した。*in vivo* α_{1D} 拮抗作用については、BOO ラットにおける無排尿性膀胱収縮 (Non-voiding contraction: NVC) の抑制作用により評価し、 ID_{50} 値として示した。抗頻尿作用は、ラットにおけるサイクロフォスファミド (CYP) 誘発頻尿モデルに対する抗頻尿作用により評価した。

第三節 イミノピリジン誘導体の合成

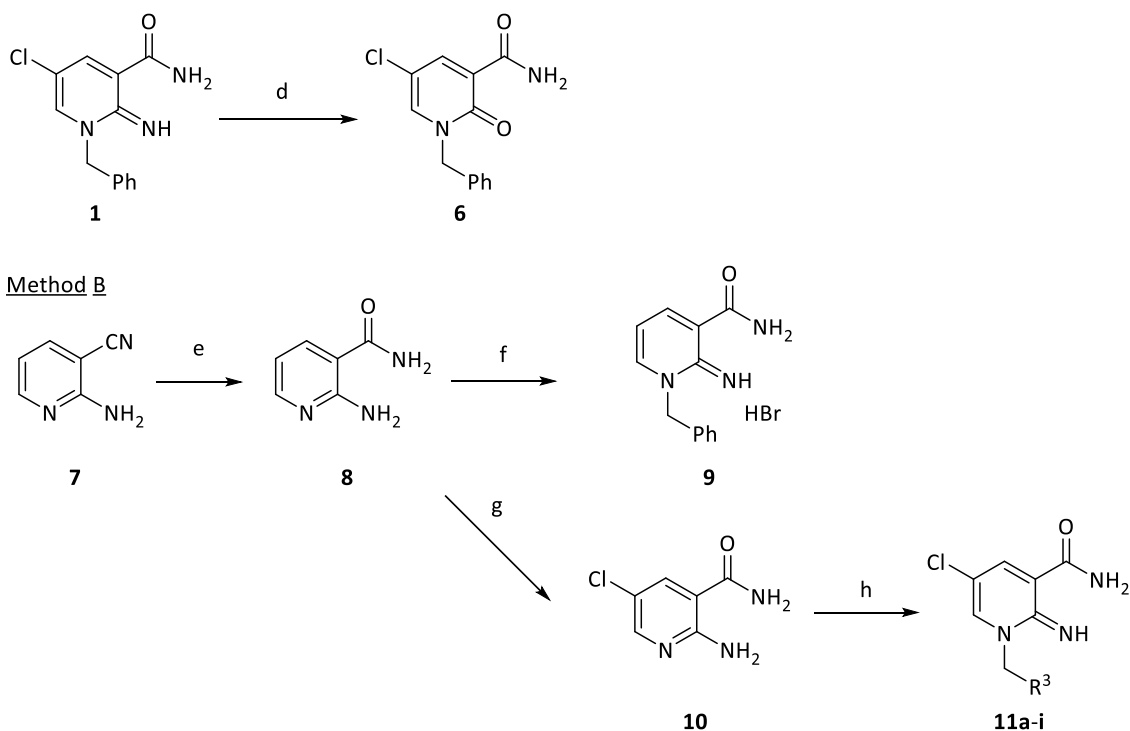
イミノピリジン系誘導体の合成は、Scheme 1 に示した Method A と Method B の2つの手法に従って行った (Scheme 1)。Method A の鍵反応は、対応するアミンとジヒドロフラン **4** との環化反応である³¹⁾。市販のアセトアミド **2a-c** を水酸化ナトリウム水溶液存在下、市販のムコクロロ酸またはムコブロム酸と反応させることによりジヒドロフラン **4a-d** を得た後、望むアミンを作用させてイミノピリジン誘導体 **5** へと導いた。また、化合物 **1** を 6 モル濃度の塩酸を用いて加水分解することによりピリドン **6** を得た。Method B の鍵反応は、2-アミノピリジン **8** または **10** と臭化ベンジル誘導体とのアルキル化反応である。イミノピリジン誘導体 **9** は、シアノピリジン **7** のシアノ基を濃硫酸で加水分解した後、臭化ベンジルとアルキル化させることにより得た。化合物 **11a-i** は、2-アミノピリジン **8** を濃塩酸存在下、30%過酸化水素水を用いて酸化的にクロロ化した後、対応するベンジルハライドと反応させて合成した。

Scheme 1. Synthesis of iminopyridine derivatives^a

Method A



4	R ²	5	4	R ²	5
4b	benzyl	5b	4a	2-chlorobenzyl	5l
4c	benzyl	5c	4a	3-chlorobenzyl	5m
4d	benzyl	5d	4a	4-chlorobenzyl	5n
4a	2,2-dimethylpropyl	5e	4a	3-methoxybenzyl	5o
4a	phenyl	5f	4a	3-(methylsulfonyl)benzyl	5p
4a	2-furylmethyl	5g	4a	1-(3-chlorophenyl)ethyl	5q
4a	2-pyridylmethyl	5h	4a	1-(3-(methylsulfonyl)phenyl)ethyl	5r
4a	3-pyridylmethyl	5i	4a	1-(3-cyanophenyl)ethyl	5s
4a	2-phenetyl	5j	4a	3-chloro-5-(methylsulfonyl)benzyl	5t
4a	2-phenylpropyl	5k	4a	5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl	5u



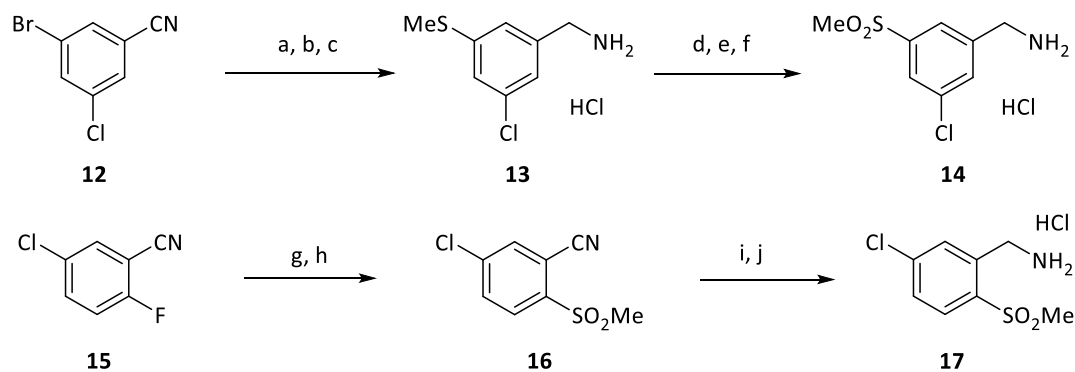
R ³	11	R ³	11
3-methylphenyl	11a	3-chloro-4-(methylsulfonyl)phenyl	11f
3-carbamoylphenyl	11b	3-chloro-4-cyanophenyl	11g
3-cyanophenyl	11c	3-chloro-5-cyanophenyl	11h
4-carbamoyl-3-chlorophenyl	11d	5-chloro-2-cyanophenyl	11i
3-carbamoyl-5-chlorophenyl	11e		

"Reagents and conditions: (a) aqueous NaOH, MeOH; (b) R²NH₂, Et₃N, EtOH, or THF, rt, then DMSO, 80 °C; (c) R²NH₂, K₂CO₃, EtOH, 80 °C; (d) 6 M HCl, reflux; (e) conc. H₂SO₄, 100 °C; (f) benzyl bromide, DMF, 80 °C; (g) 30% H₂O₂, conc. HCl, 0 to 60 °C; (h) R³CH₂Br, DMF, 100 °C.

Method A で化合物 **5t** と **5u** の合成の鍵反応に用いたメチルスルホニル基を有するベンジルアミン **14** と **17** は、Scheme 2 で示したルートを用いて合成した。市販のベンゾ

ニトリル **12** に対してナトリウムチオメトキシドを作用させ、水素化リチウムアルミニウムを用いて還元することによりメチルスルファニル誘導体 **13** を得た。次に、得られた **13** を用いて、*m*-クロロ過安息香酸によりスルファニル基をスルホニル基へと酸化してベンジルアミン **14** へと導いた。次に、市販のフルオロベンゾニトリル **15** にナトリウムチオメトキシドを作用させ、オキシソンをを用いてスルファニル基を酸化することによりメチルスルホニル誘導体 **16** を合成した。得られた **16** をラネー・コバルトを用いてニトリル基を還元することにより目的のベンジルアミン **17** へと誘導した。

Scheme 2. Synthesis of intermediate **14** and **17**^a

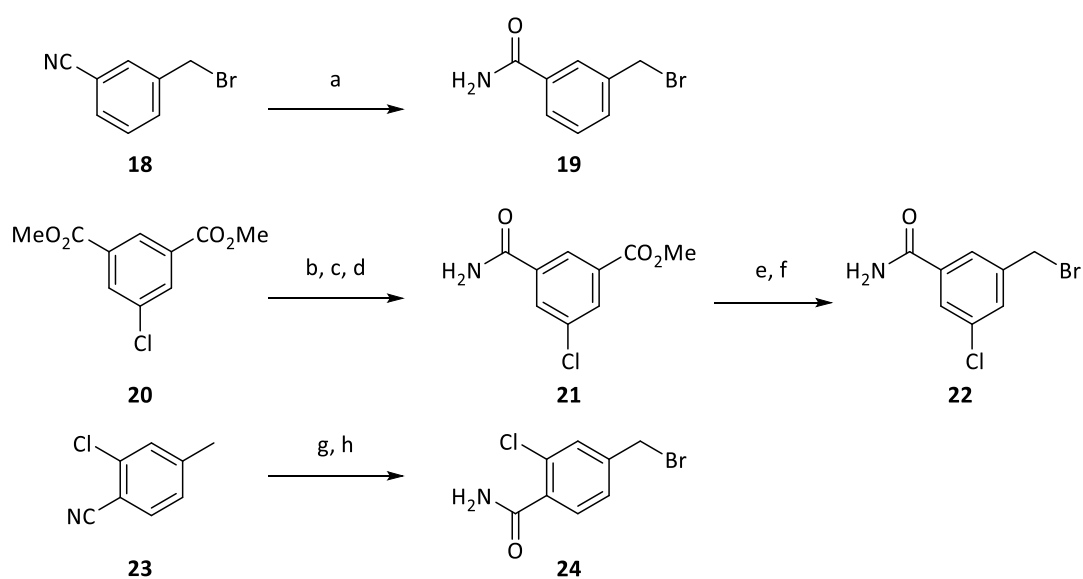


^aReagents and conditions: (a) NaSMe, *i*-Pr₂NEt, Pd₂(dba)₃, Xantphos, toluene, 90 °C; (b) LiAlH₄, THF, 0 °C to rt; (c) 4 M HCl in AcOEt, MeOH, rt; (d) Boc₂O, Et₃N, THF, rt; (e) *m*CPBA, AcOEt, rt; (f) 4 M HCl in AcOEt, MeOH, 60 °C; (g) NaSMe, DMSO, rt; (h) Oxone[®], CH₃CN, H₂O, rt; (i) Raney-Co, NH₄OH, H₂, EtOH, MeOH, rt; (j) 2 M HCl in MeOH, EtOH, rt.

Method B で化合物 **11b**, **11e** および **11d** の合成の鍵反応に用いたカルボキサミド基を有する臭化ベンジル **19**, **22** および **24** は、Scheme 3 で示したルートを用いて合成した。市販のシアノベンゼン **18** を濃硫酸により加水分解して臭化ベンジル **19** を得た。市販のイソフタル酸ジメチル **20** の片方のエステル基を 1 モル濃度の水酸化ナトリウムを用い

て加水分解したのち、アンモニアを作用させてカルボキサミド基へと変換することによりメチル安息香酸 **21** を得た。続いて、エステル基を水素化リチウムアルミニウムにより還元し、得られたベンジルアルコール体を臭素化することにより臭化ベンジル **22** へと導いた。また、市販のシアノベンゼン **23** のシアノ基を加水分解し、AIBN 存在下、NBS とラジカル反応させて目的の臭化ベンジル **24** を合成した。

Scheme 3. Synthesis of intermediate **19**, **22** and **24**^a



^aReagents and conditions: (a) conc. H_2SO_4 , 50 °C; (b) 1 M NaOH, MeOH, rt; (c) $(\text{COCl})_2$, DMF, THF, 0 °C; (d) 8 M NH_3 in MeOH, EtOH, 0 °C; (e) LiAlH_4 , THF, EtOH, rt to 60 °C; (f) Br_2 , PPh_3 , CH_3CN , rt; (g) conc. H_2SO_4 , 80 °C; (h) NBS, AIBN, AcOt-Bu, 80 °C.

第四節 イミノピリジン誘導体の初期構造活性相関

第二章第一節で示した合成計画に従い、ヒット化合物 **1** の SAR を取得することとした。まず、イミノピリジン環上の置換基効果を調べた結果を Table 1 に示した。*N*-エチルカルボキサミド誘導体 **5b**、*N,N*-ジメチルカルボキサミド誘導体 **5c** および 2-ピリドン誘導体 **6** は、化合物 **1** に比べて活性が減弱した。X 線結晶構造解析の結果、化合物 **1** の 2 位イミノ基と 3 位カルボキサミド基の間に水素結合 (2.00 Å) を形成していることが確認された (Figure 13)。5 位の置換基についてはブロモ基 (**5d**) または無置換 (**9**) の場合に比べて、クロロ基がより強い活性に寄与することがわかった。活性発現のためには、5 位の置換基として脂溶性置換基が重要と考えられるが、許容されるサイズは小さいと考えられた。次に、活性向上を指向して 1 位置換基をアルキル基やヘテロ環に変換した。*tert*-ブチルメチル基 (**5e**)、2-フリルメチル基 (**5g**)、2-ピリジルメチル基 (**5h**) および 3-ピリジルメチル基 (**5i**) を導入した化合物は、化合物 **1** に比べて 5 倍から 27 倍活性が減弱した。また、活性発現に最適なリンカー長を検討した結果、リンカーを持たないフェニル体 (**5f**) では活性が低下したもののフェネチル誘導体 (**5j**) と 3-フェニルプロピル誘導体 (**5k**) は活性が保持した。これらの結果から、1 位置換基として、1 から 3 のメチレンリンカーを持ったフェニル基が活性発現に重要であることが判明した。

Table 1. Affinity of dihydropyridine derivatives for human α_{1D} -Adrenoceptor (AR)

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	K_i (nM) ^a α_{1D}
1	NH	CONH ₂	Cl		30 [26-35]
5b	NH	CONHEt	Cl		>940
5c	NH	CONMe ₂	Cl		>940
6	O	CONH ₂	Cl		>940
5d	NH	CONH ₂	Br		160 [130-190]
9	NH	CONH ₂	H		880 [630-1200]
5e	NH	CONH ₂	Cl		820 [670-1040]
5f	NH	CONH ₂	Cl		>940
5g	NH	CONH ₂	Cl		160 [120-220]
5h	NH	CONH ₂	Cl		420 [360-500]
5i	NH	CONH ₂	Cl		250 [210-320]
5j	NH	CONH ₂	Cl		16 [14-19]
5k	NH	CONH ₂	Cl		54 [43-67]

^aReceptor binding affinity of human α_{1D} -AR. K_i value was presented as the mean of triplicate experiments with their 95% confidence intervals in brackets.

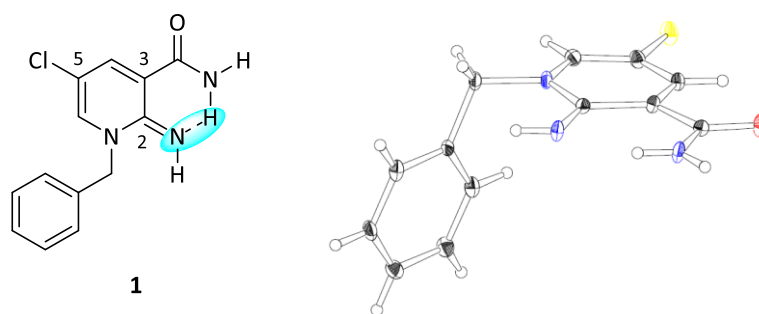


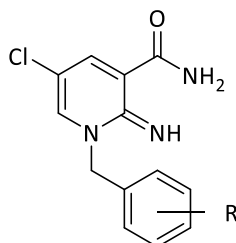
Figure 13. Chemical structure and single crystal structure of compound **1**

Table 1 の SAR 情報から **5j** と **5k** は、ヒット化合物 **1** と比べ **5j** が 2 倍、**5k** が 0.5 倍の活性を示すことが明らかとなった。これらはメチレン鎖の長さが異なるのみであり、よりリガンド効率 (ligand efficiency, LE) (**1**: LE = 0.570, **5j**: LE = 0.559, **5k**: LE = 0.495) の高い化合物 **1** を基にして更なる合成展開を進めることとし、イミノピリジン環 1 位の末端フェニル基上の置換基効果を調べることにした³²⁾。その結果を Table 2 に示した。

置換基許容性を確認するために、各位置にクロロ基を導入した結果、いずれの位置置換体も化合物 **1** と同等以上の活性を示し、中でも 3-クロロフェニル誘導体 **5m** は、化合物 **1** よりも 10 倍強力な活性を示すことが明らかになった。これらの結果に基づき、1 位末端フェニル基上 3 位の置換基効果を検討した。すなわち、脂溶性基および電子供与基としてメチル基 (**11a**) とメトキシ基 (**5o**)、極性基および電子求引基としてカルボキサミド基 (**11b**)、シアノ基 (**11c**) とメチルスルホニル基 (**5p**) を導入した結果、いずれも活性を示した。したがって、3 位置置換基は脂溶性基、電子供与基、極性基および電子求引基のいずれも許容されることが判明した。以上の結果から、1 位末端フェニル基上への置換基導入は、いずれの位置でも活性に対して許容性があり、その中でも 3 位が活性向上に最も有効であることが判明した。また、最適な 3 位の置換基変換も許容性が確認され、クロロ基が最も高い活性を示すことを明らかにした。

Table 2. Affinity of 5-chloro-3-carboxamide-2-iminopyridine derivatives with a substituted

benzyl group for human α_{1D} -AR



Compound	R	K_i (nM) ^a
		α_{1D}
1	H	30 [26–35]

5l	2-Cl	39 [33–45]
5m	3-Cl	2.6 [2.3–3.0]
5n	4-Cl	23 [19–26]
11a	3-Me	7.5 [6.3–9.0]
5o	3-OMe	8.7 [7.3–10]
11b	3-CONH ₂	26 [20–34]
11c	3-CN	10 [8.8–12]
5p	3-SO ₂ Me	52 [44–61]

^aReceptor binding affinity of human α_{1D} -AR. K_i value is presented as the mean of triplicate experiments with 95% confidence intervals in brackets.

第五節 3-クロロベンジル誘導体 **5m** の hERG 阻害作用の回避

第二章第四節で取得した初期 SAR から、最も高い活性を示した 3-クロロベンジル誘導体 **5m** をリード化合物として ADMET プロファイルを評価した。その結果、化合物 **5m** は、CYP3A4 阻害、膜透過性（PAMPA）、ヒト代謝安定性に関しては良好な値を示した一方で、強い hERG チャンネル阻害作用を示すことが判明した(47% inhibition @ 10 μ M)³³。

hERG チャンネルを阻害することは重篤な副作用を引き起し、医薬品開発に際し大きなリスクとなるため、hERG チャンネル阻害作用の低減を試みた（第一章第五節）。

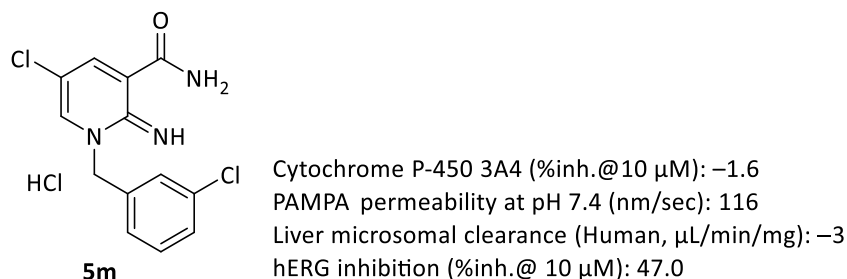
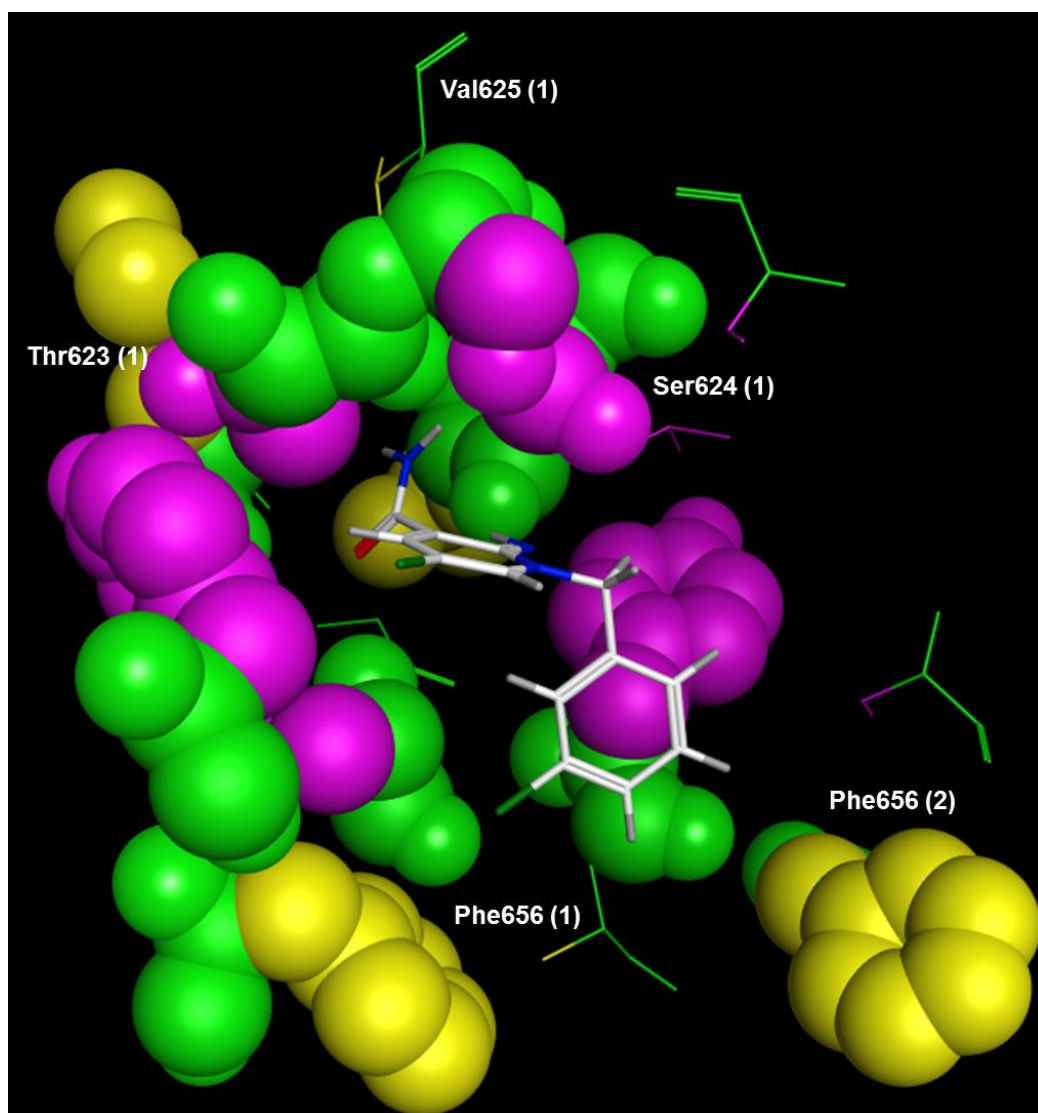


Figure 14. ADMET profile of **5m**.

第一章第五節で述べたように hERG チャンネル阻害作用を低減する方法はいくつかの手法が知られている。今回、筆者はタンデムダイマー型の変異 hERG 遺伝子を導入した動物細胞を用いて hERG チャンネルとのドッキングモデルを作成し、hERG チャンネル阻害を回避することに成功した手法を選択した²⁴⁾。すなわち、対象化合物と hERG チャンネルとのドッキングモデルを構築することにより hERG チャンネルと相互作用が強い部位を立体的に特定し、その部位を変換することにより hERG チャンネル阻害回避を行う方法である。また、一般的な hERG チャンネル阻害作用回避法として報告されている脂溶性の低減を必要に応じて適用することとした。リード化合物 **5m** に対して hERG チャンネルとのドッキングモデルを Chemical Computing Group 社の Molecular Operating Environment を用いて構築した結果を Figure 15A に示す。その結果、イミノピリジン環 1 位の末端フェニル基が Phe 656 と疎水性相互作用するとともに、3 位のカルボキサミド基は 3 つのアミノ酸残基（Thr 623、Ser624、Val625）が形成する小さなポケットを占有していることが示された。Table 1 で取得した初期 SAR 情報から 3 位カルボキサミド基は活性発現に必須であるため、変換の対象とせず Phe 656 との相互作用を低減する目的で、1 位置換

基の最適化を実施することとし、Figure 15B に示すような戦略を立てた。すなわち、i) ベンジル位にメチル基を導入し、末端フェニル基の立体配座を変えること、ii) 末端フェニル基上に極性基を導入することにより Phe 656 との相互作用を低減させること、の二つの戦略を立て合成展開を実施した。

A)



B)

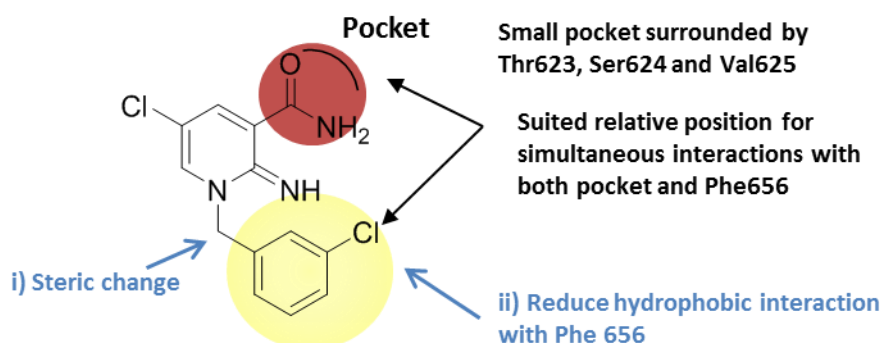


Figure 15. A) The binding mode for **5m** shown by MOE³⁴. B) Presumed **5m** (black) binding to both hERG K⁺ channel models and hypothetical modifications to avoid hERG binding (blue).

上述の i) の戦略に従い、末端フェニル基の立体配座を変化させ Phe656 との相互作用の回避による hERG チャンネル阻害作用の低減を試みた。まず、ベンジル位にメチル基を有する誘導体について検証した結果を Table 3 に示した。化合物 **5m** のベンジル位にメチル基を導入した化合物 **5q** の hERG 阻害率は、化合物 **5m** と同等であることが判明した。この結果から筆者は、メチル基の導入だけではイミノピリジン環 1 位置換基の立体配座が十分変化せず、hERG チャンネルとの相互作用を回避できなかったと考えた。そこで、hERG チャンネル阻害作用回避法の一つとして知られている脂溶性の低減を行った（戦略 ii）。化合物 **5q** の 1 位末端フェニル基上の 3 位クロロ基を親水性基に変換すれば、Phe656 との疎水性相互作用との反発を生じ、立体配座が大きく変化することによって hERG 阻害作用の低減を期待した。実際、極性基のシアノ基とメチルスルホニル基を有する化合物 **5r** と化合物 **5s** を合成した結果、3-メチルスルホニルフェニル誘導体 **5r** と 3-シアノフェニル誘導体 **5s** は化合物 **5q** より hERG 阻害率が低減した。次に、活性が保持した 3-シアノフェニル誘導体 **5s** の二つのエナンチオマーの違いについて評価した。

その結果、R 体がユートマーであり、2 倍の活性向上と hERG チャンネル阻害作用の減弱が確認された。絶対立体配置は、市販の(R)-(+)-1-Phenylethylamine から誘導した類縁体と比旋光度の比較により決定した。以上の結果から、Phe656 との疎水性相互作用を回避するためには、イミノピリジン環上 1 位側鎖末端フェニル基上 3 位のクロロ基をメチルスルホニル基またはシアノ基へと変換することが重要であることが明らかとなった。その過程において、活性を保持しつつ hERG 阻害率を低減した化合物(R)-5s を見出すことに成功した。

Table 3. Affinity for human α_{1D} -AR and hERG inhibitory activity of 1-phenethyl derivatives

Compound	R	K_i (nM) ^a α_{1D}	hERG inhibition ^b % inh. @10 μ M	clogP ^c
5m		2.6 [2.3–3.0]	47 \pm 2	1.79
5q		0.66 [0.57–0.75]	48 \pm 5	2.10
5r		15 [13–18]	19 ^d	-0.25
5s		3.4 [2.9–3.9]	32 \pm 3	0.82
(R)-5s		1.6 [1.4–1.9]	25 \pm 4	0.82
(S)-5s		130 [110–160]	57 \pm 23	0.82

^aReceptor binding affinity of human α_{1D} -AR. K_i value is presented as the mean of triplicate experiments with 95% confidence intervals in brackets. ^bPercent inhibition is represented as mean \pm standard deviation. ^ccLogP value determined using Daylight software.³⁵⁾ ^dPercent inhibition is represented as the average of duplicate measurements (n = 2).

Table 2 と Table 3 の検討から、イミノピリジン環上 1 位側鎖末端フェニル基上 3 位のクロロ基は高い活性を保持するために重要であること、Table 3 の検討により hERG 阻害回避のためにはイミノピリジン環上 1 位側鎖末端フェニル基上へ極性基の導入が有効であることが示された。そこで、イミノピリジン環上 1 位側鎖末端フェニル基上 3 位のクロロ基をもつ誘導体の中から強い活性を保持したまま、化合物(R)-**5s** より hERG 阻害作用をさらに減弱した化合物を見出すべく検討を継続した。すなわち、戦略 ii)を強い活性を示した化合物 **5m** に対して適用し、イミノピリジン環上 1 位末端 3-クロロフェニル基上に極性基を導入して Phe 656 との疎水性相互作用を減弱させることにより、hERG チャンネル阻害作用の回避を試みた (Table 4)。カルボキサミド誘導体 (**11d**, **11e**) とメチルスルホン誘導体 (**11f**, **5t** および **5u**) は、いずれも hERG 阻害が低減した。しかし、Table 3 の化合物 **5s** では hERG チャンネル阻害作用が軽減した一方で、ベンゾニトリル誘導体 (**11g**, **11h**, **11i**) は、hERG 阻害率が増大した。この理由としては、ニトリル基を導入すると分子全体の極性を高めることが期待できる一方、水素結合受容部位として働き、様々なアミノ酸と相互作用することができると考えた³⁶⁾。したがって、ベンゾニトリル誘導体は Phe 656 との疎水性相互作用を回避できず、hERG チャンネルとニトリル基との間で新たな相互作用を獲得したと考えられる。また、 α_{1D} 結合活性に関しては、R⁷に極性基を導入するとリード化合物 **5m** に比べて活性が低下したものの、R⁵または R⁶への極性基の導入は、活性が保持または向上することが判明した。以上の検討の結果、hERG

チャンネルとの阻害作用を回避するために行った極性基の導入は、カルボキサミド基またはメチルスルホニル基が疎水性相互作用回避に有効であることを見出した。さらに、ニトリル基は極性基として働く一方で、水素結合受容部位としても機能し、hERG 阻害作用を増大させる場合があることも判明した。この過程において、リード化合物 **5m** と比べて高い活性を示し、かつ hERG チャンネルとの阻害作用を低減した 3-メチルスルホニルフェニル誘導体 **5u** を見出すに至った。

Table 4. Affinity for α_{1D} -AR and hERG inhibitory activity of 2-iminopyridine derivatives containing a substituted 3-chlorobenzyl moiety

Compound	R ⁵	R ⁶	R ⁷	K_i (nM) ^a α_{1D}	hERG inhibition ^b % inh. @10 μ M	clogP ^c
5m	H	H	H	2.6 [2.3–3.0]	47 \pm 2	1.79
11d	H	H	CONH ₂	65 [52–81]	10 \pm 3	-0.36
11e	H	CONH ₂	H	3.7 [3.0–4.5]	13 \pm 3	0.47
11f	H	H	SO ₂ Me	9.4 [8.5–11]	13 \pm 4	0.28
5t	H	SO ₂ Me	H	4.8 [4.1–5.7]	14 \pm 2	0.28
5u	SO ₂ Me	H	H	1.1 [0.91–1.3]	16 \pm 3	0.28
11g	H	H	CN	11 [9.1–13]	74 \pm 2	1.10
11h	H	CN	H	0.86 [0.76–0.94]	71 \pm 12	1.23
11i	CN	H	H	8.5 [7.3–10]	59 \pm 4	1.37

^aReceptor binding affinity of human α_{1D} -AR. K_i value is presented as the mean of triplicate experiments with 95% confidence intervals in brackets. ^bPercent inhibition is represented as mean \pm standard deviation. ^ccLogP value determined using Daylight software.

第六節 サブタイプ選択性、薬物動態および薬理評価

Table 3 と 4 の *in vitro* 評価の結果、高い α_{1D} 結合活性を示し、かつ hERG 阻害作用を低減した(R)-**5s** と **5u** を選択し、 α_{1A} と α_{1B} に対するサブタイプ選択性とラットの薬物動態を評価した (Table 5)。これらの化合物は、いずれも α_{1A} と α_{1B} に対して 200 倍以上の高いサブタイプ選択性を示した。また、薬物動態を評価した結果 (ラットカセットドージング、iv 0.1 mg/kg, po 1 mg/kg)、化合物(R)-**5s** と **5u** は高い経口吸収性を示し、血中濃度推移も良好であった。とりわけ、化合物 **5u** は、長い平均滞留時間 (Mean Residence Time, MRT) の値を有しており薬効作用がより持続することが期待できる。

Table 5. Selectivity and pharmacokinetic profiles for (R)-**5s** and **5u**

Comp.	Selectivity		Pharmacokinetic parameters in rat ^{a, b}					
	1A/1D	1B/1D	Vdss ^a (mL/kg)	CL _{total} ^a (mL/h/kg)	C _{max} ^b (ng/mL)	AUC _{po} ^b (ng·h/mL)	MRT _{po} ^b (h)	F ^b (%)
(R)- 5s	>1700	>750	4676	2350	142	368	3.14	86.0
5u	200 (190–250)	800 (690–1100)	4432	2395	60.2	358	4.53	84.5

^a0.1 mg/kg, iv. Solvent: DMA/1,3-butanediol = 1:1 (v/v). ^b1 mg/kg, po (fed). Solvent: 0.5%

methylcellulose suspension. All values are the average of three rats.

化合物(R)-**5s** と **5u** が良好なサブタイプ選択性と薬物動態を示したことから、両化合物について薬理作用を精査した (Table 6)。膀胱出口部閉塞ラットの摘出膀胱筋を用いてフェニレフリンにより誘発される収縮作用の抑制効果を調べ、IC₃₀ 値で示した。(R)-**5s**

と **5u** いずれも IC_{30} が 15 nM と 12 nM の値を有し、用量依存的に膀胱収縮抑制作用を示した。膀胱出口部閉塞ラットにおいて、蓄尿期に確認される無排尿性膀胱収縮についても、(*R*)-**5s** と **5u** いずれも静脈内投与で ID_{50} 値 4.4 $\mu\text{g/kg}$ および 1.3 $\mu\text{g/kg}$ の抑制作用を持っていた。ラットにおけるサイクロフォスファミド誘発頻尿モデルにおいて、両化合物ともに最小有効用量経口投与 10 $\mu\text{g/kg}$ において排尿間隔の延長作用を示した。これらの結果により、*in vitro* におけるフェニレフリン誘発膀胱収縮と *in vivo* における無排尿性膀胱収縮は、 α_{1D} 受容体の刺激によって仲介されること、 α_{1D} 受容体拮抗薬が頻尿を効果的に緩和させることが示された。

Table 6. In vivo pharmacological data for (*R*)-**5s** and **5u**

Comp.	Phenylephrine-induced contractions ^a	Non-voiding contractions ^b	Urinary frequency ^c
	IC_{30}	ID_{50}	MED ^d
	(nM)	($\mu\text{g/kg}$, iv)	($\mu\text{g/kg}$, po)
(R)-5s	15	4.4	10
		[0.80–16]	
5u	12	1.3	10
		[0.79–2.1]	

^aEffects on the phenylephrine-induced bladder contractions in rats with BOO (n = 6–8).

^bEffects on non-voiding bladder contractions in rats with BOO (n = 5). ID_{50} values are presented as the dose required to induce a 50% reduction in non-voiding bladder contractions with 95% confidence intervals in brackets.

^cCyclophosphamide induced urinary frequency in rats (n = 5–10).

^dMED = minimum effective dose

以上の結果から、種々の *in vitro* 試験から見出された化合物(*R*)-**5s** と **5u** は、高いサブタイプ選択性と優れた薬物動態を示し、*in vivo* においても良好な薬理作用を持つことを明らかにした。

第七節 まとめ

新規選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬創出を目的として HTS を実施した結果、イミノピリジン誘導体 **1** を見出した。初期 SAR 解析から 2-イミノピリジン-3-カルボキサミド構造が α_{1D} 受容体との結合親和性に必須であり、またイミノピリジン環 1 位のベンジル基に対して置換基導入が許容されることが判明した。ヒット化合物 **1** の α_{1D} 結合活性を向上させるためにベンジル基の最適化検討を実施し、リード化合物の 3-クロロベンジル誘導体 **5m** へと導いた。しかし、化合物 **5m** は hERG 阻害作用を示したため、hERG 阻害低減のための合成展開を実施した。hERG チャンネルとの疎水性相互作用を低減させることにより hERG 阻害率を低下させる目的でベンジル位へのメチル基の導入と末端フェニル基上への極性基の導入を行った結果、hERG 阻害作用が低減し、優れたプロファイルを持った(*R*)-**5s** および **5u** を創出した。化合物 (*R*)-**5s** と **5u** は、 α_{1A} と α_{1B} に対して高いサブタイプ選択性および良好な薬物動態を有し、さらに *in vitro* と *in vivo* 双方でラット頻尿モデルに対して優れた抑制効果を示した。特に、化合物 **5u** は持続的な血中濃度を示し、かつ抗頻尿効果を示したことから開発候補化合物 (TAK-259) として選出した。また、選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬の *in vivo* における薬理作用を実施した結果、強力な薬効を示すことを初めて明らかにした。

Experimental Section

Melting points were determined on a Büchi B-545 melting point apparatus and are uncorrected. Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were recorded on Bruker Ultra Shield-300 (300 MHz) instruments. Carbon nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR) spectra were recorded on Bruker Avance II 600 (600 MHz) instruments. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) with tetramethylsilane as an internal standard. Abbreviations are used as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, br = broad. Coupling constants (J values) are given in hertz (Hz). Elemental analyses were carried out by Takeda Analytical Laboratories, Ltd., and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values unless otherwise noted. Low-resolution mass spectra (MS) were measured on a Shimadzu UFLC/MS (Prominence UFLC high pressure gradient system/LCMS-2020) with an L-column 2 ODS (3.00 mm \times 50.0 mm i.d., CERI, Japan) and Waters liquid chromatography–mass spectrometer system (MS), using a CAPCELL PAK UG-120 ODS (Shiseido Co., Ltd.) column (2.00 mm i.d. \times 50.0 mm) with aqueous CH_3CN (10–95%) containing 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) or an HP-1100 (Agilent Technologies) apparatus for monitoring at 220 nm. All MS experiments were performed using electrospray ionization (ESI) in positive ion mode. HPLC separation was carried out using a Gilson system employing the following conditions. Column: Shiseido Capcelpak C18 UG-120, S-5 μm , 20.0 \times 50.0 mm or YMC

CombiPrep Hydrosphere C18 HS-340-CC, S-5 μm , 20.0 x 50.0 mm. Mobile phase: A, 0.1% trifluoroacetic acid in water, B: 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile; gradient cycle: 0.00 min (A/B=95/5), 1.10 min (A/B=95/5), 5.00 min (A/B=0/100), 6.40 min (A/B=0/100), 6.50 min (A/B=95/5); flow rate 20 mL/min; detection UV 200 nm. After purification by preparative HPLC, the solutions were neutralized by PL-HCO₃ MP tube (200 mg cartridge, Polymer Laboratories Ltd.). Reagents and solvents were obtained from commercial sources and used without further purification. Reaction progress was determined by thin layer chromatography (TLC) analysis on Merck Kieselgel 60 F254 plates or Fuji Silysia NH plates. Chromatographic purification was carried out on silica gel columns [(Merck Kieselgel 60, 70–230 mesh or 230–400 mesh, Merck) or (Chromatorex NH-DM 1020, 100–200 mesh)] or on Purif-Pack (SI ϕ 60 μm or NH ϕ 60 μm , Fuji Silysia Chemical, Ltd.). Each compound was confirmed to be $\geq 95\%$ purity by either LC/MS or elemental analysis. Yields are not optimized.

Chemistry.

2-Cyano-2-(3,4-dichloro-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetamide (4a). To an ice-cooled mixture of 2-cyanoacetamide (**2a**) (25.3 g, 0.300 mol) and mucochloric acid (**3**) (50.4 g, 0.300 mol) in MeOH (180 mL) was added a solution of sodium hydroxide (18.0 g, 0.450 mol) in water (180 mL) at 0 °C, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The

mixture was poured into ice and 1 M HCl (200 mL), concentrated in vacuo, and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄), and concentrated in vacuo. The residue was crystallized from EtOH-*i*-Pr₂O to give the title compound (14.3 g, 20%) as pale brown solids. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 4.84 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 5.91 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.85 (br. s, 1H), 8.03 (br. s, 1H). Mp 162–163 °C.

2-Cyano-2-(3,4-dichloro-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-*N*-ethylacetamide (4b). To an ice-cooled mixture of mucochloric acid (3.00 g, 17.8 mmol) and 2-cyano-*N*-ethylacetamide (**2b**) (2.22 g, 19.8 mmol) in MeOH (10 mL) was added dropwise a solution of sodium hydroxide (1.08 g, 27.0 mmol) in water (10 mL), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was poured into ice and 1 M HCl (20 mL), and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in AcOEt. The solution was washed with brine and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated in vacuo to give the title compound as pale brown amorphous solids. This product was used for the next reaction without further purification.

2-Cyano-2-(3,4-dichloro-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)-*N,N*-dimethylacetamide (4c). To an ice-cooled mixture of mucochloric acid (5.00 g, 29.6 mmol) and 2-cyano-*N,N*-dimethylacetamide (**2c**) (3.70 g, 33.0 mmol) in MeOH (18 mL) was added dropwise a solution of sodium hydroxide (1.80 g, 45.0 mmol) in water (18 mL), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was poured into ice and

1 M HCl (20 mL), concentrated in vacuo, and dissolved in AcOEt. The solution was washed with brine and dried (MgSO₄). The solvent was evaporated in vacuo to give the title compound as a brown syrup. This material was used for the next reaction without further purification.

2-Cyano-2-(3,4-dibromo-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetamide (4d). To an ice-cooled mixture of mucobromic acid (5.00 g, 19.4 mmol) and 2-cyanoacetamide (**2a**) (1.63 g, 19.4 mmol) in MeOH (18 mL) was added a solution of sodium hydroxide (1.16 g, 29.0 mmol) in water (18 mL), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The mixture was poured into ice and 1 M HCl (200 mL), concentrated in vacuo, and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine and dried over MgSO₄. The solvent was evaporated in vacuo to give the title compound as a dark brown tar. This material was used for the next reaction without further purification.

1-Benzyl-5-chloro-N-ethyl-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5b). To a solution of **4b** (1.00 g, 3.80 mmol) in EtOH (10 mL) was added benzylamine (0.610 g, 5.69 mmol). After stirring at room temperature for 8 h, Et₃N (0.580 g, 5.73 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for further 48 h and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in DMSO (10 mL) and stirred at 80 °C for 1 h. The reaction mixture was concentrated in vacuo, and the residue was purified by preparative HPLC to afford the title compound (0.210 g, 19%) as a pale yellow solid. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.13 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H),

3.35–3.46 (m, 2H), 4.89 (s, 2H), 7.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.33–7.46 (m, 3H), 8.26 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 11.1 (br. s, 1H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 14.0, 34.2, 56.0, 117.4, 117.5, 127.4, 128.5, 128.8, 132.5, 140.8, 142.4, 151.8, 163.1. LC-MS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}^+$] calcd, 290.1; found, 290.2. Purity: 100%. Mp 140–143 °C.

1-Benzyl-5-chloro-2-imino-*N,N*-dimethyl-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5c). To a solution of **4c** (3.95 g, 15.0 mmol) in EtOH (50 mL) was added benzylamine (4.82 g, 45.0 mmol). After stirring at room temperature for 18 h, Et₃N (4.55 g, 45.0 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for further 5 h and concentrated in vacuo. A solution of the residue in DMSO (20 mL) was stirred at 60 °C for 1 h. The mixture was concentrated in vacuo, and the residue was purified by preparative HPLC to afford the title compound (0.120 g, 3%) as a yellow amorphous solid. ^1H -NMR (CDCl₃): δ 3.03 (br. s, 6H), 5.10 (s, 2H), 6.86 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.28–7.41 (m, 5H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 34.7, 37.8, 56.2, 118.2, 124.1, 127.4, 128.5, 128.9, 132.6, 138.7, 140.7, 149.5, 162.3. LC-MS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}^+$] calcd, 290.1; found, 290.0. Purity: 98.0%.

1-Benzyl-5-bromo-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5d). To a solution of **4d** (15.0 mmol) in EtOH (50 mL) was added benzylamine (4.82 g, 45.0 mmol). After stirring at room temperature for 18 h, Et₃N (4.55 g, 45.0 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for further 5 h and concentrated in vacuo. A solution of the obtained

compound in DMSO (20 mL) was stirred at 60 °C for 1 h. The mixture was concentrated in vacuo, and the residue was purified by preparative HPLC to afford the title compound (10.0 mg, 0.34%) as a pale orange amorphous solid. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 4.90 (s, 2H), 5.84 (br. s, 1H), 7.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.30–7.46 (m, 5H), 8.33 (br. s, 1H), 10.8 (br. s, 1H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.8, 103.6, 116.7, 127.3, 128.5, 128.8, 132.6, 143.1, 145.0, 152.2, 165.6. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 306.0; found, 306.2 . Purity: 98.4%.

5-Chloro-2-imino-1-(3-chlorobenzyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrochloride (5m). To an ice-cooled solution of **4a** (0.500 g, 2.10 mmol) in THF (10 mL) was added a mixture of 3-chlorobenzylamine (0.450 g, 3.20 mmol) and Et₃N (0.320 g, 3.20 mmol) in THF (3 mL). The reaction mixture was stirred for 18 h at room temperature and concentrated in vacuo to give a crystalline product. To the product were added DMSO (5 mL) and water (5 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 1 h at 80 °C and concentrated in vacuo. The residue was purified by preparative HPLC to give a pale yellow amorphous solid. This amorphous solid was dissolved in MeOH (1 mL), and 4 M HCl in AcOEt (1 mL) was added at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from EtOH and AcOEt to give the title compound (48.2 mg, 7%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 5.61 (s, 2H), 7.23–7.30 (m, 1H), 7.43–7.47 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 8.19 (br. s, 1H), 8.67–8.74 (m, 2H), 8.83 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 9.55 (br. s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.3,

116.9, 117.4, 125.9, 127.5, 128.4, 130.7, 133.4, 135.0, 141.3, 142.9, 152.3, 165.8. LC-MS

(ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 296.0; found, 296.0. Purity: 100%. Mp 160–163 °C.

Compounds **5e-l** and **5n-s** were prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **5m**, and salt formation was conducted as needed to provide crystalline solid.

5-Chloro-1-(2,2-dimethylpropyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5e).

Yield 3%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.05 (s, 9H), 3.54 (s, 2H), 5.82 (br. s, 1H), 6.36 (br. s, 1H), 7.08 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 11.1 (br. s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 26.5, 34.2, 61.6, 116.1, 116.2, 141.9, 142.7, 152.8, 165.9. LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 242.1; found, 242.3. Purity: 99.2%.

5-Chloro-2-imino-1-phenyl-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5f). Yield 10%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 5.82 (br. s, 1H), 6.17 (br. s, 1H), 7.19 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.31–7.36 (m, 2H), 7.53–7.65 (m, 3H), 8.29 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 10.9 (br. s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 103.5, 108.1, 117.2, 123.6, 127.5, 129.3, 129.7, 130.5, 139.2, 140.1, 154.0, 164.3. LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 248.1; found, 248.2. Purity: 98.6%.

5-Chloro-1-(furan-2-ylmethyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5g). Yield

8%. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4.82 (s, 2H), 5.83 (br. s, 1H), 6.40–6.42 (m, 1H), 6.43–6.46 (m, 1H), 7.21 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.24–7.29 (m, 1H), 7.46 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H),

10.81 (br. s, 1H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 49.1, 110.3, 111.4, 115.9, 116.6, 140.3, 142.5, 144.1, 144.6, 151.2, 165.1. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ calcd, 252.1; found, 252.2. Purity: 99.5%.

5-Chloro-2-imino-1-(pyridin-2-ylmethyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5h).

Yield 9%. ^1H -NMR (CDCl_3) δ 4.98 (s, 2H), 5.79 (br. s, 1H), 6.59 (br. s, 1H), 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 5.0, 7.5$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.70–7.78 (m, 1H), 8.24 (br. s, 1H), 8.63 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 10.94 (br. s, 1H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 55.9, 116.4, 116.9, 123.5, 124.4, 140.1, 142.1, 143.2, 147.0, 150.1, 152.7, 165.7. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ calcd, 263.1; found, 262.7. Purity: 100%.

5-Chloro-2-imino-1-(pyridin-3-ylmethyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5i). Yield

17%. ^1H -NMR (CDCl_3): δ 4.95 (s, 2H), 5.84 (br. s, 1H), 6.22 (br. s, 1H), 7.26–7.28 (m, 1H), 7.36 (dd, $J = 4.7, 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.23 (br. s, 1H), 8.58 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.62–8.65 (m, 1H), 10.84 (br. s, 1H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 53.1, 116.6, 117.5, 126.9, 132.6, 141.0, 141.2, 141.5, 143.1, 145.0, 152.7, 165.7. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ calcd, 263.1; found, 263.2. Purity: 100%.

5-Chloro-2-imino-1-(2-phenethyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5j). Yield 23%.

^1H -NMR (CDCl_3): δ 3.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.86 (br. s, 1H), 6.80 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.12–7.17 (m, 2H), 7.19–7.48 (m, 4H), 8.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 10.96 (br. s, 1H).

^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ 32.3, 54.6, 115.9, 116.5, 126.9, 128.3, 129.2, 136.1, 141.3, 142.4, 151.7, 165.8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ calcd, 276.1; found, 276.2. Purity: 99.5%.

5-Chloro-2-imino-1-(2-phenylpropyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5k). Yield 21%. ^1H -NMR (CDCl_3): δ 2.05–2.15 (m, 2H), 2.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 5.86 (br. s, 1H), 7.06 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.16–7.29 (m, 4H), 7.30–7.37 (m, 2H), 8.18 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 10.97 (br. s, 1H). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ 28.4, 31.3, 54.0, 115.9, 116.8, 125.9, 128.1, 128.2, 140.6, 141.4, 142.3, 151.7, 165.8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+]$ calcd, 290.1; found, 290.1. Purity: 97.9%.

5-Chloro-2-imino-1-(2-chlorobenzyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide trifluoroacetate (5l). Yield 5%. To a solution of **4a** (23.5 mg, 0.100 mmol) in EtOH (1 mL) was added a mixture of 2-chlorobenzylamine (17.0 mg, 0.120 mmol) and triethylamine (25 μL , 0.180 mmol) in EtOH (0.5 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was purified by preparative HPLC to give the title compound (2.10 mg, 5%). ^1H -NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ 5.53 (s, 2H), 6.79–6.86 (m, 1H), 7.28–7.38 (m, 1H), 7.44 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.58–7.65 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.62 (br. s, 1H), 8.66 (q, $J = 2.4$ Hz, 2H), 9.22–9.90 (m, 2H). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO-}d_6$): δ 54.8, 116.3, 117.0, 117.2, 118.3, 126.3, 127.6, 129.7, 130.2, 132.0, 141.1, 142.9, 152.7, 157.5, 165.8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+ - (\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H})]$ calcd, 296.0; found, 296.0. Purity: 100%.

5-Chloro-2-imino-1-(4-chlorobenzyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

trifluoroacetate (5n). Yield 7%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ ppm 5.52 (s, 2H), 7.30–7.36 (m, 2H), 7.47–7.52 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.56–8.62 (m, 2H), 8.78 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 9.21–9.60 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.3, 113.3, 115.3, 117.0, 117.2, 117.3, 128.8, 129.2, 131.4, 133.2, 141.2, 142.8, 152.2, 157.9, 165.7. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (CF₃CO₂H)] calcd, 296.0; found, 296.0. Purity: 100%.

5-Chloro-2-imino-1-(3-methoxybenzyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrochloride (5o). Yield 16%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.76 (s, 3H), 5.53 (s, 2H), 6.79–6.87 (m, 1H), 6.92–7.00 (m, 2H), 7.28–7.39 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 8.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.47 (br. s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.1, 55.8, 113.6, 113.8, 116.7, 117.2, 119.2, 130.1, 134.0, 141.1, 142.9, 152.2, 159.4, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HCl)] calcd, 292.1; found, 292.2. Purity: 98.9%.

5-Chloro-2-imino-1-[3-(methylsulfonyl)benzyl]-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrochloride (5p). Yield 10%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 3.24 (s, 3H), 5.66 (s, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.88–8.05 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.55–8.70 (m, 2H), 8.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.33–9.68 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 43.4, 55.4, 116.9, 117.3, 126.2, 126.9, 130.0, 132.0, 134.1, 141.2, 141.4, 143.0, 152.4, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HCl)] calcd, 340.0; found, 339.8. Purity: 100%.

5-Chloro-1-(1-(3-chlorophenyl)ethyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (5q).

Yield 6%. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 5.32 (br. s, 1 H), 5.79 (br. s, 1H), 6.35 (br. s, 1H), 7.08–7.12 (m, 1 H), 7.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.33–7.38 (m, 2H), 8.16 (br. s, 1H), 10.94 (br. s, 1H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 19.0, 59.2, 116.7, 117.9, 126.0, 127.4, 128.8, 130.8, 133.5, 137.1, 139.4, 142.7, 152.3, 165.9. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 310.0; found, 310.0. Purity: 97%.

5-Chloro-2-imino-1-(1-(3-(methylsulfonyl)phenyl)ethyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride (5r). Yield 40%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 3.26 (s, 3H), 6.24 (q, 1H, *J* = 6.7 Hz), 7.69–7.76 (m, 2H), 7.94–8.00 (m, 1H), 8.04 (br. s, 1H), 8.23 (br. s, 1H), 8.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.66 (br. s, 1H), 9.80 (br. s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 19.1, 43.3, 59.13, 116.9, 117.7, 125.9, 127.3, 130.1, 132.3, 137.2, 138.5, 141.4, 142.6, 152.6, 166.0. LC-MS (ESI) *m/z* [M + H⁺ – (HCl)] calcd, 354.1; found, 354.0. Purity: 100%.

5-Chloro-1-(1-(3-cyanophenyl)ethyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride (5s). Yield 8%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 6.19 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.61–7.69 (m, 1H), 7.71–7.79 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 9.79 (br. s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 19.0, 58.9, 111.8, 116.9, 117.8, 118.4, 130.0, 131.2, 132.3, 132.5,

137.2, 138.5, 142.5, 152.7, 166.1. LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 301.1; found, 301.0.

Purity: 100%.

5-Chloro-1-((1*R*)-1-(3-cyanophenyl)ethyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride ((*R*)-5s). To an ice-cooled solution of **4a** (6.42 g, 27.3 mmol) in MeOH (60 mL) was added a mixture of (*R*)-3-(1-aminoethyl)benzonitrile (8.00 g, 54.7 mmol, >99% ee) and Et₃N (7.60 mL, 54.5 mmol) in MeOH (10 mL). The reaction mixture was stirred for 18 h at 45 °C and concentrated in vacuo to give a crystalline product. To the residue was added acetic acid (50 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 4 h at 50 °C and concentrated in vacuo. The residue was basified by 8 M NaOH and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 7:3–1:0) to give a pale brown oil. To this oil in EtOH (3 mL) was added 4 M HCl in AcOEt (3 mL) at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration, recrystallized from EtOH and H₂O, and washed with AcOEt to give the title compound (5.32 g, 58%, 98.9% ee) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 6.24 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.60–7.71 (m, 1H), 7.71–7.80 (m, 1H), 7.85–7.93 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.69 (s, 1H), 9.71–9.96 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 19.0, 59.0, 111.8, 116.9, 117.8, 118.4, 130.0, 131.2, 132.3, 132.4, 137.2, 138.6, 142.6, 152.7, 166.11. LC-MS (ESI): m/z

[M + H⁺] calcd, 301.1; found, 301.2. Purity: 100%. Anal. Calcd for C₁₅H₁₄Cl₂N₄O: C, 53.43; H, 4.18; N, 16.62. Found: C, 53.33; H, 4.39; N, 16.59. Mp 191–193 °C. [α]_D²⁵ +157 (*c* 0.526, MeOH).

5-Chloro-1-((1*S*)-1-(3-cyanophenyl)ethyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride ((*S*)-5s**).** Optical resolution of **5s** (174 mg, 0.516 mmol) was conducted by HPLC (Chiralcel OJ (JL001), 50 mm i.d. × 500 mm length, solvent phase hexane/EtOH/diethylamine = 700/300/1) after desalting. The desired fraction with larger retention time was separated and concentrated in vacuo. To the residue (66.9 mg, 98.3% ee) in EtOH (1 mL) was added 4 M HCl in AcOEt (1 mL) at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration, recrystallized from EtOH and H₂O, and washed with AcOEt to give the title compound (52.9 mg, 30%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 6.12–6.27 (m, 1H), 7.60–7.69 (m, 1H), 7.71–7.78 (m, 1H), 7.86–7.93 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.57–8.73 (m, 2H), 9.66–9.97 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 19.0, 58.9, 111.8, 116.9, 117.8, 118.4, 130.0, 131.2, 132.3, 132.5, 137.1, 138.5, 142.5, 152.7, 166.1. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 301.1; found, 301.2. Purity: 100%. Mp 195–199 °C. [α]_D²⁵ –145 (*c* 0.921, MeOH).

5-Chloro-1-[3-chloro-5-(methylsulfonyl)benzyl]-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride (5t**).** A mixture of **4a** (1.68 g, 7.16 mmol),

1-[3-chloro-5-(methylsulfonyl)phenyl]methanamine hydrochloride (**14**) (2.20 g, 8.59 mmol), and K₂CO₃ (2.97 g, 21.5 mmol) in EtOH (30 mL) was stirred overnight at 85 °C. To the reaction mixture was added 1 M NaOH until the mixture was made basic, and the product was extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on NH silica gel (AcOEt/MeOH = 1:0-17:3) to give a pale yellow amorphous solid. This amorphous solid was dissolved in MeOH, and 4 M HCl/AcOEt (3 mL) was added at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from EtOH and AcOEt to give the title compound (630 mg, 21%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.31 (s, 3H), 5.65 (s, 2H), 7.78 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.92 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.03 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 9.56 (s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 43.1, 55.0, 116.9, 117.3, 124.9, 126.8, 132.2, 134.3, 136.3, 141.4, 142.8, 143.0, 152.6, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HCl)] calcd, 374.0; found, 373.8. Purity: 100%. Anal. Calcd for C₁₄H₁₄Cl₃N₃O₃S: C, 40.94; H, 3.44; N, 10.23. Found: C, 40.96; H, 3.46; N, 10.11. Mp 276–277 °C.

5-Chloro-1-[5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl]-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride (5u). A mixture of **4a** (7.65 g, 32.5 mmol), 1-[5-chloro-2-(methylsulfonyl)phenyl]methanamine hydrochloride (**17**) (10.0 g, 39.0 mmol), and potassium carbonate (11.9 g, 85.9 mmol) in EtOH (100 mL) was stirred overnight at 85 °C.

To the reaction mixture was added 1 M sodium hydroxide until the mixture was made basic, and the product was extracted with AcOEt and THF. The extract was washed with brine, dried (MgSO_4) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on NH silica gel (AcOEt/MeOH = 4:1) to give a pale yellow amorphous solid. This amorphous solid was dissolved in MeOH, and 4 M HCl in AcOEt (15 mL) was added at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from MeOH and H_2O , and AcOEt to give the title compound (3.80 g, 28%) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 3.43 (s, 3H), 5.82 (br. s, 2H), 7.14 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.22 (br. s, 1H), 8.66 (br. s, 3H), 9.65 (br. s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 44.5, 54.5, 116.8, 117.3, 126.6, 129.3, 132.5, 134.2, 136.9, 139.3, 141.0, 143.0, 153.2, 166.0. LC-MS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}^+ - (\text{HCl})$] calcd, 374.0; found, 374.2. Purity: 99.4%. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: C, 40.94; H, 3.44; N, 10.23. Found: C, 40.93; H, 3.56; N, 10.15. Mp 256 °C.

1-Benzyl-5-chloro-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (6). A mixture of **1** (0.250 g, 0.960 mmol) and 6 M HCl (10 mL) was stirred under reflux for 15 h. The mixture was adjusted to pH 5 with ammonium hydroxide. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with AcOEt to give the title compound (0.210 g, 83%) as a pale brown solid. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 5.43 (s, 2H), 7.22–7.29 (m, 2H), 7.33–7.46 (m, 3H), 8.34 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.38–8.71 (m, 1H), 8.48 (d, J = 2.5 Hz, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 55.0, 116.9, 123.6, 127.1,

128.3, 128.9, 133.0, 138.2, 142.7, 154.0, 162.9. LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 263.1; found, 263.2. Purity: 97.2%. Mp 216–219 °C.

2-Aminopyridine-3-carboxamide (8). A solution of 2-aminopyridine-3-carbonitrile (**7**) (0.500 g, 4.20 mmol) in concentrated sulfuric acid (5 mL) was stirred at 100 °C for 5 h. The mixture was poured into ice–water and adjusted to pH 8 with saturated sodium hydrogen carbonate solution. The precipitate was collected by filtration and washed with water to give the title compound (0.290 g, 50%) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 6.55 (dd, $J = 4.8$, 7.6 Hz, 1H), 7.19 (br. s, 2H), 7.32 (br. s, 1H), 7.92 (dd, $J = 1.7$, 7.6 Hz, 1H), 7.94 (br. s, 1H), 8.06 (dd, $J = 1.7$, 4.8 Hz, 1H). Mp 197–198 °C.

1-Benzyl-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrobromide (9). A mixture of **8** (0.100 g, 0.730 mmol) and benzyl bromide (0.250 g, 1.46 mmol) in DMF (3 mL) was stirred at 80 °C for 18 h. After addition of toluene to the mixture, the resulting precipitate was collected by filtration and washed with AcOEt to give the title compound (0.100 g, 45%) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 5.56 (s, 2H), 7.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 7.34–7.47 (m, 3H), 8.10 (br. s, 1H), 8.40 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.56 (br. s, 1H), 9.30 (br. s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ 55.5, 111.9, 115.8, 127.3, 128.4, 128.9, 132.8, 142.8, 143.5, 153.1, 166.9. LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 228.1; found, 228.2. Purity: 100%. Mp 226–228 °C.

2-Amino-5-chloropyridine-3-carboxamide (10). To a mixture of **8** (2.00 g, 14.6 mmol) and conc HCl (12 mL) was added 30% hydrogen peroxide (1.20 mL) at 0°C. After stirring at 60°C for 1 h, the mixture was diluted with water. The reaction mixture was basified with 1 M NaOH and extracted with THF and AcOEt. The organic layer was washed with brine, dried (MgSO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography (AcOEt/hexane = 4:1–1:0) to give the title compound (0.940 g, 38%) as colorless crystals. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.35 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.97–8.07 (m, 2H), 8.09 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H). Mp 226–228 °C.

1-(3-Carbamoyl-5-chlorobenzyl)-5-chloro-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrobromide (11e). A mixture of **10** (150 mg, 0.870 mmol) and 3-carbamoyl-5-chlorobenzyl bromide (258 mg, 1.04 mmol) in DMF (3 mL) was stirred at 100 °C for 3 h, cooled to room temperature, and diluted with AcOEt. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from MeOH and AcOEt to give the title compound (110 mg, 30%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.57 (s, 2H), 7.61 (s, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.63 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 9.42 (s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 48.5, 55.3, 117.0, 125.0, 127.1, 129.9, 133.4, 135.0, 136.5, 141.4, 142.9, 152.4, 165.7. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HBr)] calcd, 339.0; found, 338.8. Purity: 95.8%. Mp 237–239 °C.

Compounds **11a-d** and **11f-i** were prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **11e** and desalting, purification and salt formation conducted as needed to provide crystalline solids.

5-Chloro-2-imino-1-(3-methylbenzyl)-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrobromide (11a). Yield 41%. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.31 (s, 3H), 5.50 (s, 2H), 7.00–7.24 (m, 3H), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 9.38 (s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 20.9, 55.9, 116.8, 117.2, 124.2, 127.8, 128.8, 129.1, 132.3, 138.2, 141.2, 142.8, 152.2, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HBr)] calcd, 276.1; found, 276.2. Purity: 96.9%.

1-(3-Carbamoylbenzyl)-5-chloro-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrobromide (11b). Yield 42%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.59 (s, 2H), 7.39–7.55 (m, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.40 (s, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.8, 116.9, 117.3, 126.4, 127.3, 128.8, 129.9, 132.7, 134.7, 141.3, 142.8, 152.3, 165.7, 167.1. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HBr)] calcd, 305.1; found, 305.2. Purity: 100%.

5-Chloro-1-(3-cyanobenzyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrobromide

(11c). Yield 28%. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.60 (2 H, s), 7.64 (2 H, d, *J* = 4.9 Hz),

7.79–7.90 (2 H, m), 8.21 (1 H, s), 8.60 (1 H, s), 8.65 (1 H, d, $J = 2.3$ Hz), 8.80 (1 H, d, $J = 2.3$ Hz), 9.44 (2 H, s). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 55.3, 111.7, 117.0, 117.3, 118.3, 129.9, 130.7, 132.1, 132.1, 134.1, 141.3, 142.8, 152.4, 165.8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+ - (\text{HBr})]$ calcd, 287.1; found, 287.0. Purity: 100%.

1-(4-Carbamoyl-3-chlorobenzyl)-5-chloro-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrobromide (11d). Yield 30%. ^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 5.55 (s, 2H), 7.24 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.61 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.82 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 9.28 (s, 2H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 55.1, 117.1, 117.4, 125.7, 128.6, 129.0, 130.0, 135.0, 137.0, 141.2, 142.9, 152.2, 165.7, 167.5. LC-MS (ESI): m/z : $[\text{M} + \text{H}^+ - (\text{HBr})]$ calcd, 339.1; found, 338.8. Purity: 95.4%.

5-Chloro-1-[3-chloro-4-(methylsulfonyl)benzyl]-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide hydrochloride (11f). Yield 12%. ^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 3.38 (s, 3H), 5.68 (s, 2H), 7.46 (dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.78 (1H, s), 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.62–8.72 (m, 2H), 8.82 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 9.54 (br. s, 2H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 42.4, 55.0, 117.0, 117.3, 126.4, 130.5, 130.7, 131.4, 137.6, 140.4, 141.4, 143.0, 152.6, 165.8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}^+ - (\text{HCl})]$ calcd, 374.0; found, 374.2. Purity: 97.2%.

5-Chloro-1-(3-chloro-4-cyanobenzyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrobromide (11g). Yield 27%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 5.60 (s, 2H), 7.39 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.52–8.67 (m, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.24–9.64 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 55.2, 111.6, 115.6, 117.1, 117.4, 126.4, 128.6, 134.8, 135.5, 140.1, 141.3, 143.0, 152.6, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HBr)] calcd, 321.0; found, 321.0. Purity: 100%.

5-Chloro-1-(3-chloro-5-cyanobenzyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrobromide (11h). Yield 23%. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.56 (s, 2H), 7.74–7.80 (m, 1H), 7.81–7.88 (m, 1H), 8.02–8.14 (m, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.53–8.70 (m, 2H), 8.71–8.81 (m, 1H), 9.21–9.66 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 54.9, 113.3, 117.0, 117.1, 117.5, 129.5, 131.7, 132.4, 134.1, 136.3, 141.4, 142.9, 152.6, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HBr)] calcd, 321.0; found, 321.0. Purity: 100%.

5-Chloro-1-(5-chloro-2-cyanobenzyl)-2-imino-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide

hydrochloride (11i). Yield 9%. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.76 (s, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 8.20–8.28 (m, 2H), 8.62–8.81 (m, 3H), 9.38–9.85 (m, 2H). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 54.7, 112.3, 115.5, 116.9, 117.3, 127.2, 132.9, 133.0, 133.5, 135.2, 141.3, 143.2, 152.9, 165.8. LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺ – (HCl)] calcd, 321.0; found, 321.0. Purity: 100%.

1-[3-Chloro-5-(methylsulfanyl)phenyl]methanamine hydrochloride (13). A mixture of 3-bromo-5-chlorobenzonitrile (**12**) (4.00 g, 18.5 mmol), sodium thiomethoxide (1.42 g, 20.3 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0) (84.0 mg, 0.09 mmol), Xantphos (106 mg, 0.180 mmol) and diisopropylethylamine (4.78 g, 37.0 mmol) in toluene (100 mL) was stirred at 90 °C for 9 h. The reaction mixture was poured into 1 M HCl and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:20) to give 3-chloro-5-(methylsulfanyl) benzonitrile (2.60 g, 72%) as colorless solids. To a suspension of lithium aluminium hydride (0.790 g, 20.8 mmol) in THF (200 mL) was added 3-chloro-5-(methylsulfanyl)benzonitrile (3.20 g, 17.4 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature, and sodium sulfate decahydrate was added thereto. The mixture was stirred for further 0.5 h at room temperature and filtered. The filtrate was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in MeOH (3 mL), and 4 M HCl in AcOEt (10 mL) was added at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from MeOH and AcOEt to give the title compound (2.80 g, 72%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.52 (s, 3H), 4.00 (s, 2H), 7.31 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 8.51 (s, 3H). LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 187.0; found, 186.9. Mp 185–186 °C.

1-[3-Chloro-5-(methylsulfonyl)phenyl]methanamine hydrochloride (14). To a mixture of **13** (2.60 g, 11.6 mmol) and Et₃N (2.35 g, 23.2 mmol) in THF (100 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (3.80 g, 17.4 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 4 h at room temperature, then 1 M HCl was added, and the mixture was extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in AcOEt (100 mL), and *m*CPBA (7.15 g, 41.4 mmol) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature, and aqueous NaHCO₃ was added. The organic layer was separated and washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on NH silica gel (AcOEt/hexane = 1:1) to give colorless oil. To a solution of this oil in MeOH (70 mL) was added 4 M HCl in AcOEt (10 mL) at room temperature, the mixture was stirred for 0.5 h at 60 °C, and the reaction mixture was concentrated in vacuo. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with AcOEt to give the title compound (2.41 g, 81%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.30 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 8.01 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.55 (s, 3H). LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 220.0; found, 219.9. Mp 239–241 °C.

5-Chloro-2-(methylsulfonyl)benzonitrile (16). To a solution of 5-chloro-2-fluorobenzonitrile (**15**) (5.00 g, 32.1 mmol) in DMSO (100 mL) was added 21% sodium thiomethoxide in water (15.0 mL, 45.0 mmol) at room temperature. After stirring for 2 h

at room temperature, water (200 mL) was added to the reaction mixture, which was stirred for 0.5 h. The resulting precipitate was collected by filtration and was washed with water to give 5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzonitrile (4.60 g, 78%) as a colorless solid. To a solution of 5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzonitrile (1.00 g, 4.54 mmol) in acetonitrile (15 mL) was added dropwise a solution of Oxone (6.98 g, 11.4 mmol) in water (20 mL) over 2 h, and the mixture was stirred overnight at room temperature. To the reaction mixture was added water (25 mL), and the mixture was stirred for 3 h at 0 °C. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with water (40 mL) to give the title compound (915 mg, 93%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.41 (s, 3H), 8.08–8.13 (m, 2H), 8.44 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H). LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 216.0; found, 215.9. Mp 164–166 °C.

1-[5-Chloro-2-(methylsulfonyl)phenyl]methanamine hydrochloride (17). To a solution of **16** (3.82 g, 17.7 mmol) in EtOH (25 mL) were added 8 M ammonia in MeOH (5 mL, 40.0 mmol) and Raney Co (19.0 g, 17.7 mmol), and the mixture was stirred overnight under hydrogen atmosphere. The mixture was filtered through Celite, and the filtrate was concentrated in vacuo. To the residue were added EtOH (20 mL) and 2 M HCl/MeOH (10 mL). The mixture was stirred for 1 h at room temperature and concentrated in vacuo. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with AcOEt to give the title compound (3.61 g, 80%) as a colorless solid. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.37 (s, 3H), 4.44 (s, 2H), 7.65–7.89 (m, 1H), 7.89–8.27

(m, 2H), 8.61 (br. s, 3H). LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 220.0; found, 219.9. Mp 248–250 °C.

3-(Bromomethyl)benzamide (19). A mixture of 3-(bromomethyl)benzonitrile (**18**) (2.00 g, 10.2 mmol) and conc. H_2SO_4 (5 mL) was stirred at 50 °C for 30 min. The reaction was quenched with ice, and the mixture was extracted with AcOEt and THF. The extract was washed with brine, dried ($MgSO_4$), and concentrated in vacuo to give the title compound (200 mg, 9%) as a colorless solid. 1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ 4.74 (s, 2H), 7.35–7.49 (m, 2H), 7.56–7.63 (m, 1H), 7.77–7.84 (m, 1H), 7.91–8.07 (m, 2H). LC-MS (ESI): m/z $[M + H^+]$ calcd, 214.0; found, 214.0. Mp 140–143 °C.

3-(Bromomethyl)-5-chlorobenzamide (22). A mixture of dimethyl 5-chlorobenzene-1,3-dicarboxylate (**20**) (1.00 g, 4.37 mmol) and 1 M sodium hydroxide (4.37 mL, 4.37 mmol) in MeOH (15 mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was acidified with 1 M HCl and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried ($MgSO_4$), and concentrated in vacuo to give 3-chloro-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (640 mg, 68%) as colorless solids. To a solution of 3-chloro-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (500 mg, 2.33 mmol) and DMF (1 drop) in THF (20 mL) was added oxalyl chloride (444 mg, 3.50 mmol) at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was concentrated in vacuo. The residue was dissolved in THF (20 mL), and 8 M ammonia in MeOH

(2 mL) was added at 0 °C. After stirring at room temperature for 14 h, the reaction mixture was poured into saturated sodium hydrogen carbonate and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo to give methyl 3-carbamoyl-5-chlorobenzoate (**21**) (350 mg, 70%) as colorless solids. To a solution of **21** (2.20 g, 10.3 mmol) in THF (30 mL) and EtOH (3 mL) was added lithium borohydride (335 mg, 15.4 mmol) at room temperature. After stirring at 60 °C for 2 h, the reaction was quenched with ice, and the mixture was extracted with AcOEt. The extract was washed with 1 M HCl and brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 5:1) to give 3-chloro-5-(hydroxymethyl)benzamide (950 mg, 50%) as a colorless solid. To a suspension of triphenylphosphine (1.27 g, 4.86 mmol) in acetonitrile (50 mL) was added bromine (0.250 mL, 4.86 mmol) at room temperature. After stirring at room temperature for 30 min, 3-chloro-5-(hydroxymethyl)benzamide (900 mg, 4.86 mmol) was added to the reaction mixture. After stirring at 85 °C for 2 h, the reaction mixture was poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with saturated sodium hydrogen carbonate and brine, dried (MgSO₄), and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt:hexane = 1:1) to give the title compound (540 mg, 45%) as a amorphous solid.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.74 (s, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.71 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.86 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.91 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H). LC-MS (ESI): *m/z* [M + H⁺] calcd, 247.9; found, 247.9.

4-(Bromomethyl)-2-chlorobenzamide (24). A mixture of 2-chloro-4-methylbenzonitrile (**23**) (2.00 g, 13.2 mmol) and conc. sulfuric acid (5 mL) was stirred for 10 h at 80 °C. The reaction mixture was cooled to 0 °C, basified with aqueous sodium hydroxide, and extracted with THF and AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo to give 2-chloro-4-methylbenzamide (1.25 g, 56%) as a colorless solid. A mixture of 2-chloro-4-methylbenzamide (1.05 g, 6.19 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.32 g, 7.43 mmol), and AIBN (50.0 mg, 0.300 mmol) in *tert*-butyl acetate (25 mL) was stirred for 1 day at 80 °C. The reaction mixture was poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 5:2) to give a mixture of the title compound and 2-chloro-4-methylbenzamide as a colorless solid (620 mg). This mixture was used in the next step without further purification.

X-ray structure analysis

Crystal data for **1**: C₁₃H₁₂ClN₃O, MW = 261.71; crystal size, 0.80 x 0.50 x 0.30 mm; yellow, prism; triclinic, space group P-1, $a = 4.783(2) \text{ \AA}$, $b = 10.456(5) \text{ \AA}$, $c = 13.295(6) \text{ \AA}$, $\alpha = 112.39(2)^\circ$, $\beta = 94.07(3)^\circ$, $\gamma = 92.33(3)^\circ$, $V = 611.5(5) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $D_x = 1.421 \text{ g/cm}^3$, $T = 293 \text{ K}$, $\mu = 2.695 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda = 1.54190 \text{ \AA}$, $R1 = 0.059$, $wR2 = 0.152$.

All measurements were made on a Rigaku R-Axis RAPID diffractometer using graphite monochromated Cu-K α radiation. The structure was solved by direct methods with SHELXS-97 and was refined using full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-97.³⁷⁾ All non-H atoms were refined with anisotropic displacement parameters.

CCDC 1058155 for **1** contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/Community/Requestastructure/Pages/DataRequest.aspx?>.

Drawing Structure

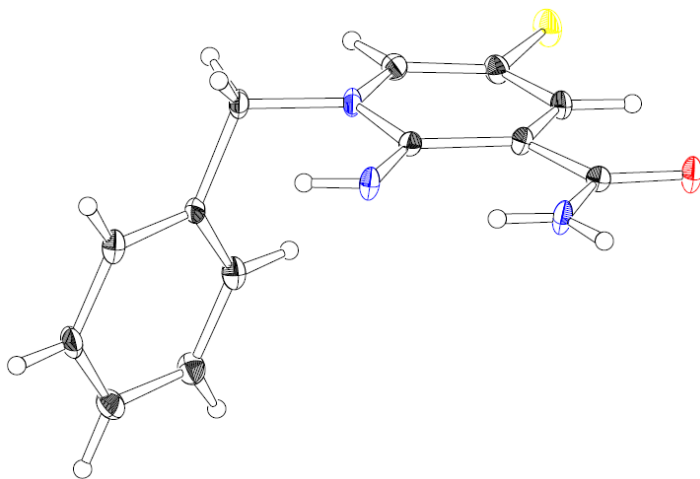


Figure 16. ORTEP of **1**, thermal ellipsoids are drawn at 30% probability.

Biology.

α_1 Binding Assay

Membranes of human α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -adrenoceptors were prepared from CHO-K1 cells stably expressing each α_1 -adrenoceptor. Binding assay for adrenergic α_1 receptor was performed in 200 μ L of α_1 binding assay buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10.0 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L EDTA and 0.5% BSA) containing membrane protein (10 μ g for each α_1 receptor) and 2.5 nmol/L 7-methoxy-[3H]-prazosin in the presence of compound at 12 different concentrations. Following incubation at room temperature for 60 min, the membranes were

filtered through GF/C filter plates (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) and washed with 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5). The membrane-associated radioactivity was determined using TopCount liquid scintillation counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Nonspecific binding was defined as binding in the presence of 10.0 μ mol/L phentolamine. IC₅₀ values and 95 % confidence intervals were calculated by logistic regression analysis. The K_d values of α_1 receptor subtypes (α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D}) were 0.930, 0.350 and 0.260 nmol/L, respectively. K_i values were calculated as $K_i = IC_{50} / \{1 + (^3H\text{-ligand concentration}) / K_d\}$.³⁸⁾

hERG inhibition assay

hERG/CHO cells stably expressing hERG channel were purchased from Millipore (UK) Ltd. (catalog number CYL3038). Cells were cultured at 32 °C, 5% CO₂ in Ham's F-12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 500 μ g/mL Geneticin (Invitrogen). The hERG inhibition assay was performed on the IonWorks Quattro (Molecular Devices) system in population patch clamp (PPC) mode. The extracellular solution was phosphate-buffered salines (PBS) with calcium and magnesium (catalog number 14040, Invitrogen). The intracellular solution contained 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 20 mM HEPES, pH 7.3, with KOH. After perforation using 100 μ g/mL amphotericin B (Sigma-Aldrich), hERG current was measured under the potential-clamp protocol (holding potential -80 mV, the first voltage 40 mV: 2 sec, the second voltage -50 mV: 2 sec). The peak tail current before addition of the

compounds was measured as the pre hERG current. Test compounds were incubated on the cells for a period of 5 min. The peak tail current after addition of the compounds was measured as the post hERG current. %hERG inhibition was calculated (n = 3 or 4) according to the following.

$$\%hERG \text{ inhibition} = 100 - (\text{post hERG current} / \text{pre hERG current}) \times 100.$$

Evaluation of reversible inhibition of Cytochrome P450 3A4.

Human liver microsomes were purchased from Xenotech, LLC (Lenexa, KS). Inhibition activity of a test compound of cytochrome P450 3A4 was evaluated by incubating midazolam with 0.100 mg/mL human microsomes in the presence of 10 μ M test compound. The incubation mixture was allowed to stand for 10 min at 37 °C, and then the incubation was terminated by addition of acetonitrile/water. After centrifugation, the supernatant was subjected to LC/MS/MS analysis to measure the peak of 1'-hydroxymidazolam.

In vitro metabolic clearance in human hepatic microsomes.

Human liver microsomes were purchased from Xenotech, LLC (Lenexa, KS). An incubation mixture consisted of microsomal protein in 50 mM KH_2PO_4 – K_2HPO_4 phosphate buffer (pH 7.4) and 1 μ M test compound. The concentration of microsomal protein was 0.2 mg/mL. An NADPH-generating system containing 5 mM MgCl_2 , 5 mM glucose-6-phosphate, 0.5 mM β -NADP⁺, and 1.5 units/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase was added to the incubation

mixture to initiate the enzyme reaction. The reaction was terminated 15 and 30 min after the initiation of the reaction by mixing the reaction mixture with acetonitrile, followed by centrifugation. The supernatant was subjected to LC/MS/MS analysis. The metabolic velocity was calculated as the slope of the concentration-time plot.

Pharmacokinetic analysis in rat cassette dosing.

Test compounds were administered intravenously (0.100 mg/kg, solvent: DMA/1,3-butanediol = 1:1) or orally (1 mg/kg, solvent: 0.5% methylcellulose suspension) by cassette dosing to fed rats. After administration, blood samples were collected and centrifuged to obtain the plasma fraction. The plasma samples were deproteinized followed by centrifugation. The compound concentrations in the supernatant were measured by LC/MS/MS.

Organ bath study

Animals and surgical procedure.

All animal experiments in this study were approved by the Takeda Experimental Animal Care and Use Committee. Surgical procedures used to produce partial BOO in rats were in accord with the previously published method³⁹. Male Wistar rats at age 7 weeks (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) were used. A midline longitudinal incision was made in the lower abdomen under intraperitoneal sodium pentobarbital (50 mg/kg) anesthesia. The 2 prostate lobes were

retracted to expose the bladder neck and the urethra. The urethra was tightly ligated to a glass tube 1.2 mm in diameter using a 4-zero silk suture and the glass tube was then removed. In sham operated rats only prostate retraction was performed. Penicillin (2000 IU/rat, Meijiseika, Inc., Tokyo, Japan) was administered subcutaneously after the abdomen was closed with suture.

Tissue preparation.

The rats 2-4 weeks after the BOO surgery were sacrificed and the bladders were carefully removed. After measuring the wet weight of the bladder, 4-6 longitudinal strips (7-10×3 mm) were cut out from the bladder dome except the trigone. As the case, the bladder was reversed and the urothelium of the half area was gently peeled away, and 2 strips (7-10×3 mm) were cut out from urothelium denuded area and intact area respectively.

Tension measurement.

Each bladder strip was placed in 20 mL organ baths containing modified Krebs solution (NaCl 120.7, KCl 5.9, NaHCO₃ 15.5, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, and D-glucose 11.5 mmol/L), which was bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at 37 °C. The strip was connected to an isometric transducer (TSD125C; BIOPAC Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA) and an amplifier (DA100C; BIOPAC systems Inc.) and the change in tension of the strip was digitally recorded at a sampling rate of 5 Hz using data-acquisition

software (Acknowledge; BIOPAC Systems Inc.) on a computer system equipped with an analog-to-digital converter (MP-100A-CE; BIOPAC Systems Inc.). After an initial tension of 1 g was applied to each strip which was allowed to equilibrate for at least 60 minutes, following experiments were operated.

Cumulative concentration response curves were obtained with (*R*)-(-)-phenylephrine hydrochloride (PHE, 10^{-8} - 10^{-4} mol/L) or (-)-norepinephrine (NE, 10^{-9} - 10^{-5} mol/L), respectively. The α_1 -AR antagonists (**5u** at 1, 10 and 100 nM and (*R*)-**5s** at 10, 100 and 1000 nM) were cumulatively administrated every 30 minutes after PHE (3×10^{-6} mol/L) to investigate the antagonistic effects. One hundred mmol/L KCl-modified Krebs solution (NaCl 26.6, KCl 100, NaHCO₃ 15.5, NaH₂PO₄ 1.20, CaCl₂ 2.50, MgCl₂ 1.20, and D-glucose 11.5 mmol/L) was replaced at the end of each experiment.

Data Analysis. The recorded data were analyzed by the following two methods.

% KCl method; the maximum tensions of the last 1 minute for each observation period and after 100 mmol/L KCl stimulation were measured, respectively. The changes of tension [(the maximum tension of each period) – (the maximum tension of pretreatment)] were calculated and standardized by 100 mmol/L KCl-induced tension change [(the maximum tension of 100 mmol/L KCl) – (the maximum tension of pre-100 mmol/L KCl)].

Standard deviation (stddev.) method; since PHE and NE induced characteristic contractions with persistent and rhythmic oscillations in BOO rat bladder strips, stddev. of the tensions was measured to evaluate the amplitude of the oscillations. The stddev.s of the tensions for the last 3 or 5 minutes in each observation period were determined, and the change before and after drug treatment was calculated. To evaluate the effects of the α_1 -AR antagonists and the β -adrenoceptor agonist, % inhibition was obtained by dividing stddev. of each observation period with the α_1 -AR antagonists by the change of the stddev. after PHE treatment. The % inhibition for each concentration of α_1 -AR antagonists was corrected by the change of stddev. of corresponding vehicle treatment. Statistical analysis was performed using the SAS System for Windows (Release 8.2, SAS Institute). IC₃₀ values were calculated by logistic regression analysis with corrected % inhibitions.

Measurement of cystometrogram in rats with BOO

Surgical procedure of creation of BOO

Surgical procedures used to produce partial BOO in rats were in accord with the previously published method³⁹. Male Wistar rats at age 7 weeks (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) were used. A midline longitudinal incision was made in the lower abdomen under intraperitoneal

sodium pentobarbital (50 mg/kg) anesthesia. The 2 prostate lobes were retracted to expose the bladder neck and the urethra. The urethra was tightly ligated to a glass tube 1.2 mm in diameter using a 4-zero silk suture and the glass tube was then removed. In sham operated rats only prostate retraction was performed. Penicillin (2000 IU/rat, Meijiiseika, Inc., Tokyo, Japan) was administered subcutaneously after the abdomen was closed with suture.

Catheter implantation

Rats were anesthetized with approximately 3% isoflurane inhalation (Abbott Japan Co., Ltd) 1 day before measurement of cystometrogram. A lower midline abdominal incision was made to expose the bladder, and two polyethylene catheters (PE-50; Becton, Dickinson and Company) with the end flared by heat were tied to the bladder dome to measure the intravesical pressure and infuse saline into the bladder, respectively. These two catheters were connected to silicon tubes (SH No.00; Kaneka Medix Corporation). For intravenous injection, a polyethylene catheter (PE-50) filled with physiological saline containing sodium heparin (Ajinomoto Corporation) was tied to a jugular vein. The catheter and two tubes were tunneled subcutaneously, and externalized at the back of the neck. The free ends of the catheters were sealed. Each rat was housed with free access to food and water in individual cages, and allowed to recover.

Cystometric investigation

The rats more than 2 weeks after the BOO surgery were used. After rats were placed in Ballman's cages (KN-326 type3; Natsume Seisakusyo Co., Ltd.), two bladder catheters (PE-50) tied to the bladder dome previously were connected to a pressure transducer (DX-100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) and a syringe pump (Model 100; KD Scientific, New Hope, PA, USA) for recording the intravesical pressure and for intravesical infusion of physiological saline, respectively. Urine volumes were measured by using electronic balances (GX-400; A&D, Tokyo) placed under Ballman's cages. Intravesical pressure was measured with a pressure transducer connected to a pressure amplifier (AP-641G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan), and the signal was recorded at a sampling rate of 10 Hz using data acquisition software (Acknowledge; BIOPACK Systems, Santa Barbara, CA, USA) on a computer system equipped with an analog-to-digital converter (MP100A-CE; BIOPACK Systems). Physiological saline was continuously infused into the bladder at the rate of 4-9 mL/h. Tested drugs were intravenously administrated at increasing doses after confirming stable NVCs. Higher dose of drug was administered just after confirming the effect on lower dose of drug.

Statistics

NVCs were quantified in the 5 minutes before micturition and were defined as number of bladder contractions more than 30% of the maximum bladder contraction. Average of 2 NVCs just before administration was evaluated as pre-value. NVCs in the micturition seen first 10 minutes after administration were evaluated as post value. % pre-value was calculated as the ratio of post-value divided by pre-value. Data were expressed as mean \pm S.E.M. ID₅₀ value, the dose required to induce a 50% reduction in the NVC, and 95% confidential limit were determined by logistic curve. Statistical analysis was performed the SAS Systems for Windows (version 5.0, SAS Institute).

Measurement of cystometrogram in rats with cyclophosphamide (CYP)

Injection of CYP

Female Sprague-Dawley rats weighing 220-330 g (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) were used. Rats were intraperitoneally administered with CYP (Sigma-Aldrich) at a dose of 140 mg/kg. CYP was dissolved in saline and administered at a volume of 5 mL/kg.

Cystometric investigation

The rats 3 days after the CYP injection were used. After rats were placed in Ballman's cages, two bladder catheters (PE-50) tied to the bladder dome previously were connected to a pressure transducer and a syringe pump for recording the intravesical pressure and for intravesical infusion of physiological saline, respectively. Urine volumes were measured by using electronic balances placed under Ballman's cages. Intravesical pressure was measured with a pressure transducer connected to a pressure amplifier (AP-641G; Nihon Kohden, Tokyo, Japan and 1257; Sanei, Tokyo, Japan), and the signal was recorded at a sampling rate of 10 Hz using data acquisition software on a computer system equipped with an analog-to-digital converter. Physiological saline was continuously infused into the bladder at the rate of 6 mL/h. Voiding intervals in CYP-treated rats and vehicle-treated rats were measured. To evaluate the effects of tested drugs for the urinary frequency, these drugs were administered in CYP-treated rats with distinct urinary frequency. Specifically, these drugs were administered to CYP-treated rats at voiding intervals less than 7.2 minutes that were seen only 10% in vehicle-treated rats statistically.

Statistics

The average voiding intervals during 30 minutes were calculated in CYP-treated rats and vehicle-treated rats. Student's t-test was used to assess statistical significance of differences among the groups. The average voiding intervals during 30 minutes before administration were defined as pre-value. The average voiding intervals from 5 to 35 minutes after administration were defined as post-value. % pre-value was calculated as the ratio of post-value divided by pre-value. One-tailed Williams' test was used to assess statistical significance of differences among the groups. Significance was defined as $P \leq 0.025$. All statistical analysis was performed the SAS Systems for Windows.

References

- (32) Kuntz, I. D.; Chen, K.; Sharp, K. A.; Kollman, P. A. The maximal affinity of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9997-10002.
- (33) Avdeef, A.; Strafford, M.; Block, E.; Balogh, M. P.; Chambliss, W.; Khan, I. Drug absorption *in vitro* model: filter-immobilized artificial membranes: 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 271-280.
- (34) *Molecular Operating Environment* (MOE), 2012.10; Chemical Computing Group Inc.; Montreal, Canada, 2012.
- (35) (a) ClogP value was determined by using Daylight Software in August 6, 2014. (ClogP, version 4.82, Daylight Software, Daylight Chemical Information Systems, Inc., Aliso Viejo, CA; <http://www.daylight.com>.) (b) pKa value was determined by using Accelrys Software in February 10, 2016. (pKa, version 9.0, PipelinePilot, Accelrys Software Inc., San Diego, CA; <http://accelrys.com>.)
- (36) Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. Nitrile-containing pharmaceuticals: Efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7902-7917.
- (37) Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112-122.
- (38) (a) Cheng Y. and William H. P. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108. (b) Michael M. and Rita R. Practical aspects of radioligand binding. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2006**, 1.3.1–1.3.42.

- (39) Hashimoto, T.; Nagabukuro, H.; Doi, T. Effects of the selective acetylcholinesterase inhibitor TAK-802 on the voiding behavior and bladder mass increase in rats with partial bladder outlet obstruction. *J. Urol*, **2005**, *174*, 1137–1141.

第三章 新規フェノキシエチルアミン系化合物の創出

第一節 既存の α_1 受容体拮抗薬を元にした合成戦略の立案

序論で述べたように、HTS により見出されたヒット化合物を基にした合成展開とは異なる戦略として、既存の α_1 受容体拮抗薬の情報を元にした分子設計を行う戦略により、新規 α_{1D} 受容体拮抗薬を探索した。 α_1 受容体拮抗薬として市販されているタムスロシンは、サブタイプ選択性は低いものの非常に高い α_{1A} と α_{1D} 受容体結合活性を示す。また、序論でも述べた化合物 A は、選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬として報告されている (Figure 17)。

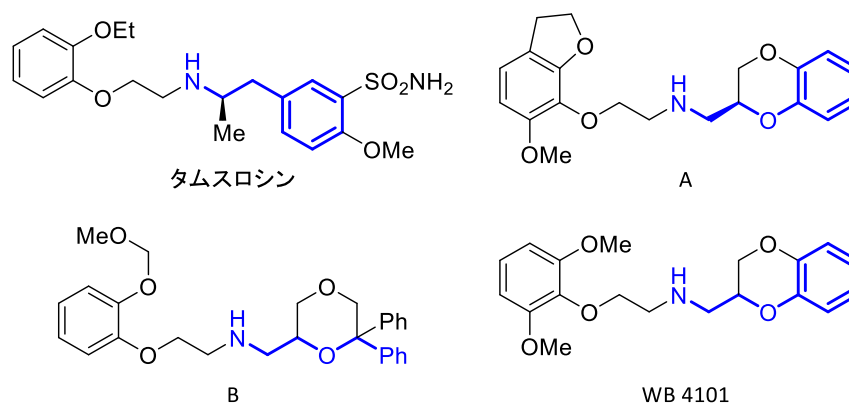
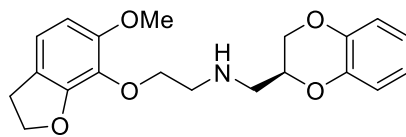


Figure 17. Structure of phenoxyethylamine derivatives as α_1 adrenoceptor antagonist.

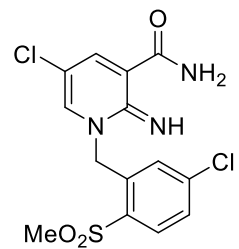
これら 2 つの化合物の他にも共通構造としてフェノキシエチルアミン骨格を主骨格として持つ誘導体 B や WB4101 が、 α_1 受容体拮抗薬として報告されていることから、フェノキシエチルアミン構造が α_1 受容体に対する活性発現に重要であると考えた⁴⁰⁾。そこで、社内化合物ライブラリからサブタイプ選択性が高い化合物を見出すべくフェノキシエチルアミン構造をもつ化合物を抽出し、それらの評価を行った。その結果、 α_{1D}

に対して 17 nM の活性を持ち、 α_{1A} と α_{1B} に対して高いサブタイプ選択性を持つ化合物 **25** を見出した (Table 7)。化合物 **25** は、上述したタムスロシンや化合物 **A** など従来報告されているフェノキシエチルアミン誘導体に比べて高いサブタイプ選択性を示した。しかし、化合物 **25** の α_{1D} 受容体結合活性は、化合物 **A** と第二章で述べた化合物 **5u** と比べて低く、膀胱収縮抑制作用も化合物 **5u** に比べて低いことが明らかとなった。膀胱収縮抑制作用が低い原因は、主活性が弱いと考えられることから、サブタイプ選択性の高い化合物 **25** を出発化合物として、サブタイプ選択性を保持し高い活性を持つ化合物を見出すべく構造活性相関の取得を行った。

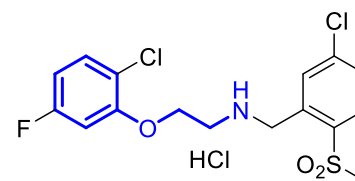
Table 7. In vitro data and LLE of **A**, **5u** and **25**.



A



5u



25

comp	K_i (nM) ^a	LLE ^b	selectivity		phenylephrine-induced contraction ^c , IC ₃₀ (nM)
	α_{1D}		1A/1D	1B/1D	
A	2.2 ^d	6.0	1.1 ^d	10 ^d	—
5u	1.1	8.7	200	800	12
25	17	4.3	110	65	250

^a K_i value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

^bLLE = $-\log(K_i) - \text{clogP}$.

^cEffects on the phenylephrine-induced contractions of the bladder strips taken from the rats with BOO (n = 2–11).

^dThe data were taken from the literature²²⁾.

見出された **25** を元に合成展開するにあたり、主活性向上のために必要な変換部位を推定する目的で文献報告されている α_1 受容体拮抗薬の SAR 情報も活用して合成戦略を立てた。Fumagalli らは、フェノキシ部位の置換基検討を行い序論で述べた化合物 **A** を創出した²²⁾。化合物 **A** は、ヒトの組織を用いた親和性試験においてサブタイプ選択性が低いものの、高い α_{1D} 受容体親和性を示した。一方、Zhao らが見出した化合物 **C** は、 α_{1D} に対する親和性を保持し、シロドシンと比べて α_{1A} 受容体に対してより高い選択性を示した⁴¹⁾。さらにフェノキシ基上 5 位にフルオロ基を持つ化合物 **D** は、高い α_{1D} 受容体親和性を示し、化合物 **C** よりさらに α_{1A} 受容体に対して高い選択性を持っていた。これらの知見から、フェノキシ部は α_{1D} 受容体に対して高い選択性を持つ誘導体を見出すために重要な置換基であると考えた。

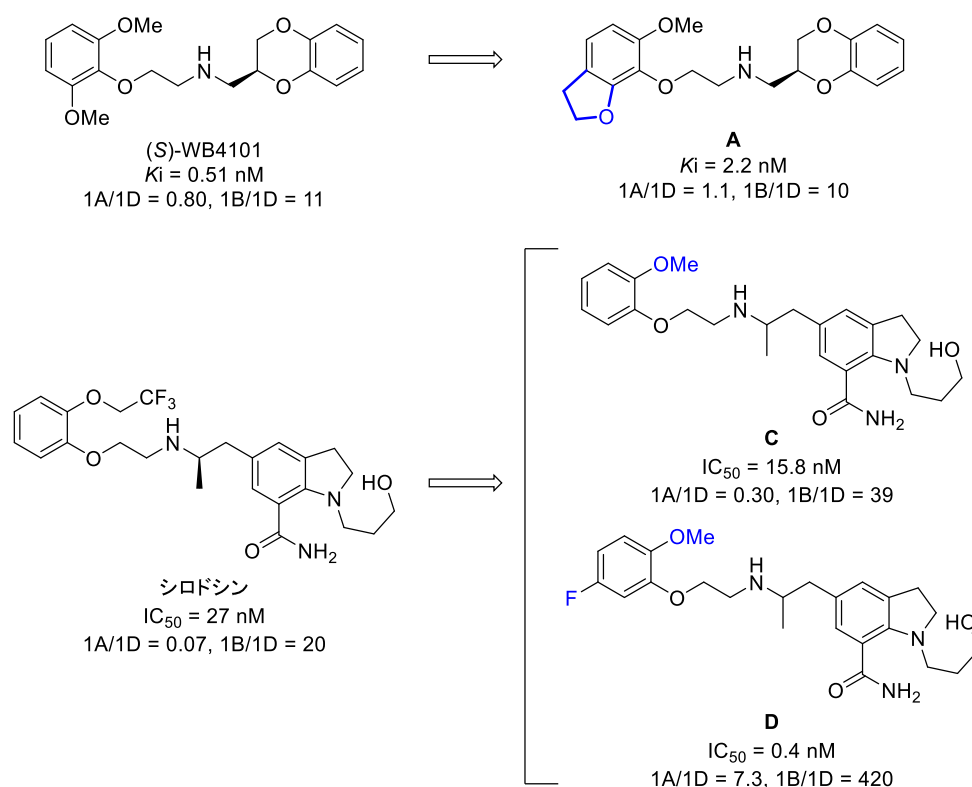


Figure 18. Reported phenoxyethylamine derivatives of α_1 adrenoceptor antagonist. Data of **A**, **C** and **D** are reported in ref 22 and 41.

上述した論文情報から筆者は、化合物 **25** が高いサブタイプ選択性を示した理由は、2-クロロ-5-フルオロフェノキシ基の構造に由来するものと推定した。したがって、本化合物の初期 SAR 取得は、2-クロロ-5-フルオロフェノキシ基を固定し、フェノキシエチルアミン誘導体のベンジルアミノ部位を変換することにより、 α_{1D} 受容体に対して高い選択性を保持しつつ高い活性を発現するために必要な部分構造を探索することを目的に実施した。また、薬剤として相応しい活性と脂溶性のバランスを測る一つの指標として用いられる LLE は、化合物 **A** や **5u** は市販薬の平均である 6 以上と良好である一方で、化合物 **25** の値は 4.3 であり、改善の余地があると考えた (Table 7)。したがって、より優れた薬剤へと導くべく主活性の向上とともに LLE を指標とした合成展開を実施した。(Figure 19)。

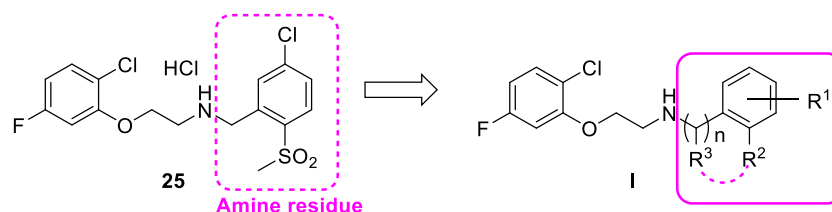


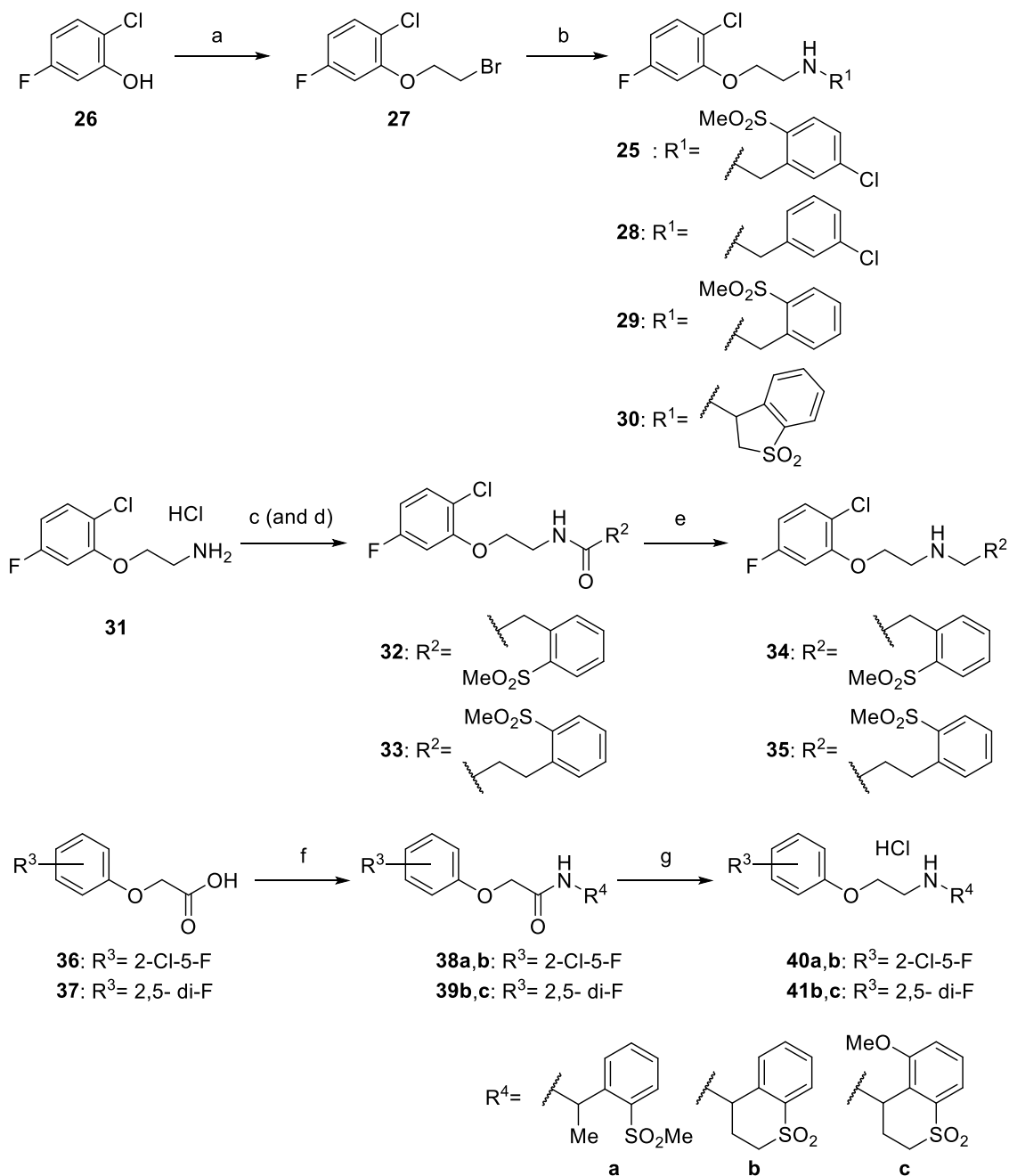
Figure 19. Design strategy.

第二節 フェノキシエチルアミン誘導体の合成

目的物の合成は以下に示す Scheme 4 から 6 に示した方法により合成した。化合物 **25**, **28** から **30**, **34**, **35**, **40** と **41** の合成について Scheme 4 にまとめた。2-クロロ-5-フルオロフェノキシエチルアミン誘導体 **25**、**28**、**29** および **30** は、市販のフェノール **26** を水酸化ナトリウム存在下、1,2-ジブロモエタンと反応させフェノキシエチルブロミド **27** を得た後、対応するベンジルアミンとそれぞれアルキル化反応させることにより得た。メチレンリンカー長を伸長した化合物 **34** と **35** は、市販のフェノキシエチルアミン **31** を対

応するカルボン酸と縮合反応を行いフェノキシエチルアミド **32** と **33** へと変換した後、ボラン THF 錯体を用いてアミノ基へ還元することにより導いた。次に、市販のフェノキシ酢酸誘導体 **36** と **37** に対して適切なアミンを縮合反応させることにより、フェノキシアセトアミド **38** と **39** へと変換した後、ボラン THF 錯体を用いてアミドを還元することにより目的のフェノキシエチルアミン誘導体 **40** および **41** を合成した。

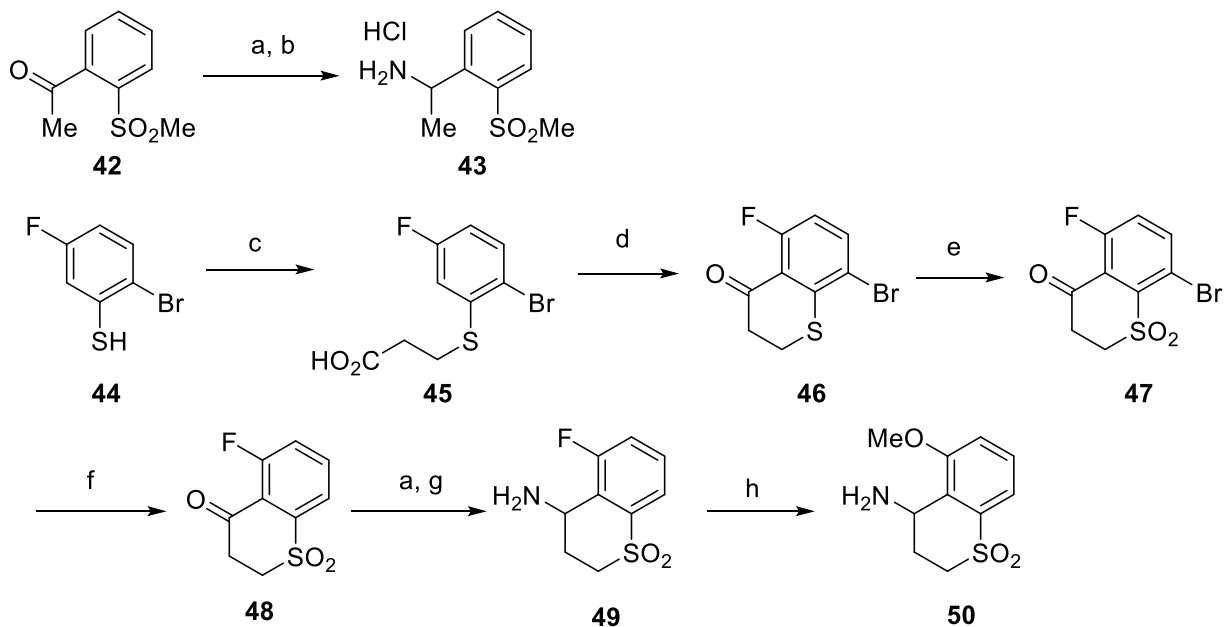
Scheme 4. Synthesis of **25**, **28–30**, **34**, **35**, **40** and **41**^a



^aReagents and conditions: (a) 1,2-dibromoethane, 1 M NaOH, 90 °C; (b) $R^1\text{NH}_2$, K_2CO_3 , EtOH, 90 °C; (c) $R^2\text{CO}_2\text{H}$, WSC, HOBt, Et_3N , DMF; (d) *m*CPBA, AcOEt; (e) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF, 0 to 80 °C; (f) $R^4\text{NH}_2$, WSC, HOBt, Et_3N , CH₃CN or DMF; (g) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF, 0 to 80 °C then 4 M HCl in AcOEt.

化合物 **40a** と **41c** を合成する際に用いた中間体のフェネチルアミン **43** とチオクロマン-4-アミン **50** は、Scheme 5 に示した方法により合成した。まず、市販のアセトフェノン **42** のカルボニル基をオキシムにした後、還元することによりフェネチルアミン **43** を得た。続いて、市販のベンゼンチオール **44** を 3-ブロモプロピオン酸とのアルキル化反応により化合物 **45** へと導いた後、濃硫酸を用いて環化し、*m*CPBA で酸化することによりスルファニル基をスルホニル基に変換した。ブロモ基を水素添加により還元、カルボニル基をオキシムを経由し、アミノ基へと変換し、最後にナトリウムメトキシドを用いて求核置換反応を行い、フルオロ基をメトキシ基に置換することによりチオクロマン-4-アミン **50** を合成した。

Scheme 5. Synthesis of intermediates **43** and **50**^a

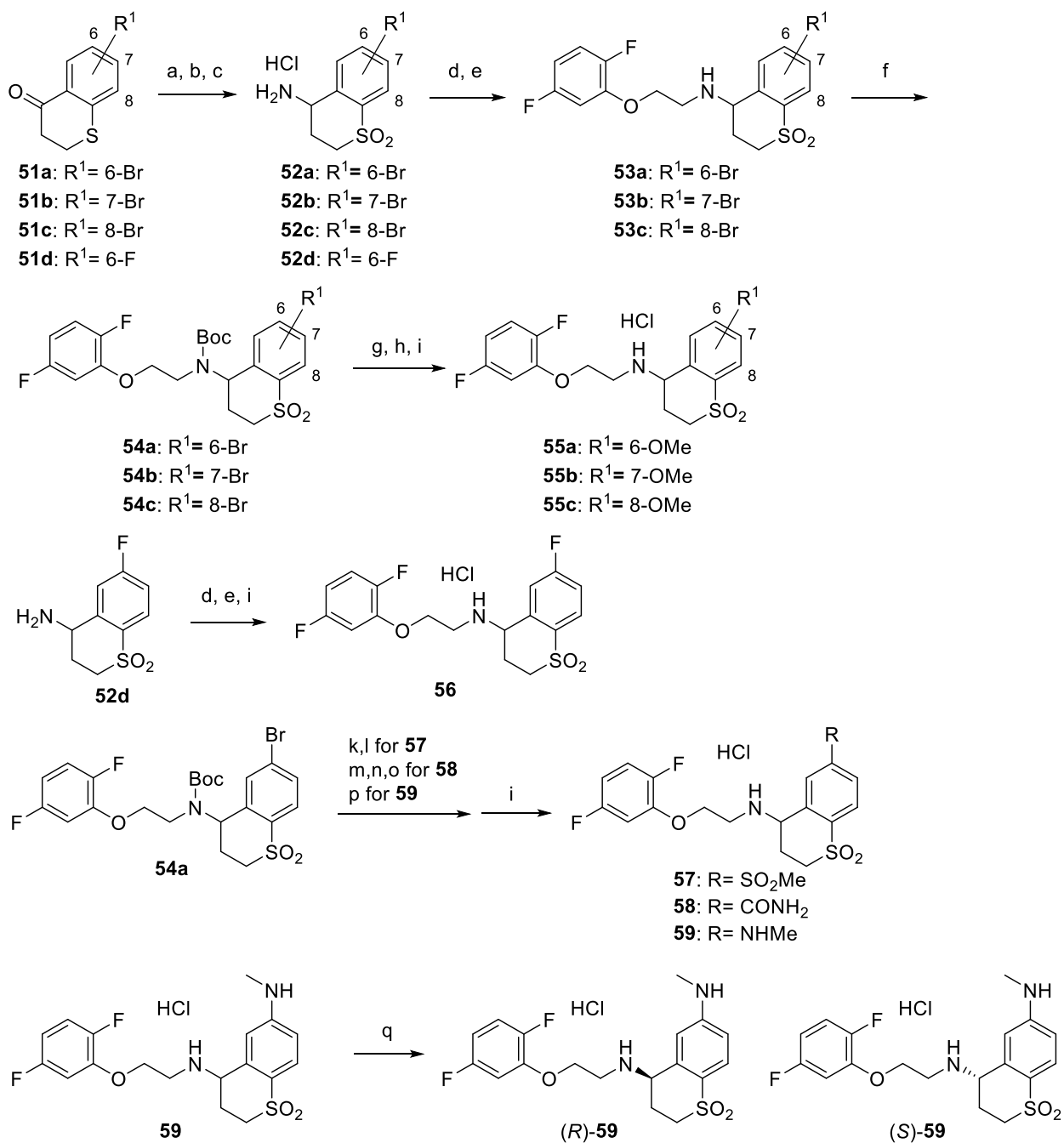


^aReagents and conditions: (a) MeONH₂·HCl, pyridine; (b) BH₃·THF, THF, 0 to 80 °C then 4 M HCl in AcOEt; (c) 8 M NaOH, H₂O, then 3-bromopropionic acid, K₂CO₃, H₂O; (d) conc. H₂SO₄; (e) *m*CPBA, AcOEt, 0 °C; (f) Pd/C, H₂, EtOH; (g) BH₃·THF, THF, 0 to 80 °C; (h) NaOMe, MeOH, rt to 95 °C.

Scheme 6 に化合物 **55** から **59** までの合成法をまとめた。中間体 **53** と **54** は Scheme 4 に記載した方法と同様の手法を用いて合成した。化合物 **53** は、**51a–c** のケトン部位をアミノ化し、スルファニル基を酸化してスルホニル基へと変換し、アミド化反応した後、ボラン THF 錯体を用いてアミノ基とすることにより得た。続いて、アミンを Boc 基で保護して化合物 **54** へ導いた。チオクロメン環上にメトキシ基を有するフェノキシエチ

ルアミン誘導体 **55a-c** は、ブロモ基を水酸化カリウムによりヒドロキシ基へ変換し、メチル化を行った後、Boc 基を脱保護することにより導いた。化合物 **51d** をアミノ化と酸化反応して得られた中間体 **52d** は、アミド化、ボラン還元が続いて 4 モル濃度塩化水素酢酸エチル溶液を用いて塩酸塩として化合物 **56** へと変換した。中間体 **54a** は、化合物 **57-59** を合成するための出発物質として用いた。メチルスルホニル誘導体 **57** は、カップリング反応によりメチルスルファニル基を導入し、酸化してスルホニル基に変換し脱保護反応後、塩酸塩にすることにより合成した。カルボキサミド誘導体 **58** は化合物 **54a** を一酸化炭素挿入反応することによりメチルエステルを得、加水分解、アミド化、脱保護後、塩酸塩として得た。最後に、メチルアミン誘導体 **59** は、化合物 **54a** にカップリング反応によりメチルアミノ基を導入後、脱保護して得た。光学活性体(*R*)-**59** と(*S*)-**59** は、ラセミ体 **59** をキラル超臨界流体クロマトグラフィーにより分割した。Figure 20 に示した単結晶 X 線結晶構造解析および Ellman's imine を用いて調製したキラル原料から誘導した類縁体の比旋光度の比較により絶対立体配置を決定した。

Scheme 6. Synthesis of **55–59**^a



^aReagents and conditions: (a) MeONH₂·HCl, pyridine; (b) BH₃·THF, THF, 0 to 80 °C

then Boc₂O, AcOEt; (c) *m*CPBA, AcOEt then 4 M HCl in AcOEt; (d) **37**, WSC, HOBT,

Et₃N, DMF; (e) BH₃·THF, THF, 0 to 80 °C; (f) Boc₂O, AcOEt, (g) KOH, Pd₂dba₃, *t*-BuXphos, DME, H₂O, 100 °C; (h) Iodomethane, K₂CO₃, DMF, (i) 4 M HCl in AcOEt; (j) Zn(CN)₂, Pd(PPh₃)₄, DMF, 100 °C; (k) NaSMe, Pd₂dba₃, Xantphos, xylene, 140 °C; (l) *m*CPBA, AcOEt; (m) CO, Pd(OAc)₂, dppf, Et₃N, MeOH, THF; (n) 1 M NaOH, THF; (o) HOBt·NH₃, WSC, *i*-Pr₂NEt, DMF; (p) Methylamine, Pd₂dba₃, XPhos, NaO-*t*-Bu, toluene, 100 °C; (q) Optical resolution by chiral supercritical fluid chromatography (SFC).

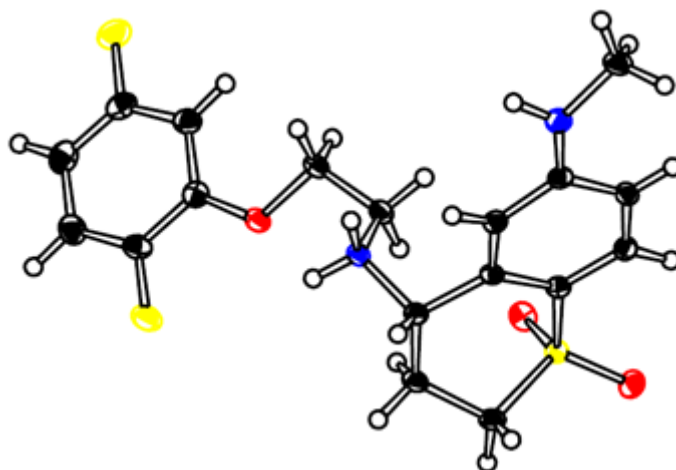


Figure 20. ORTEP diagram of (*S*)-**59**, thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.

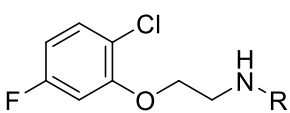
第三節 フェノキシエチルアミン誘導体 **25** の活性およびサブタイプ選択性に必要な部分構造の同定

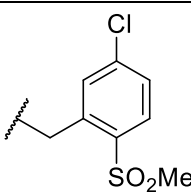
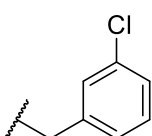
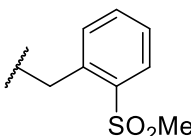
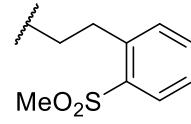
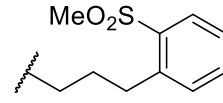
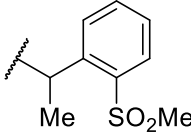
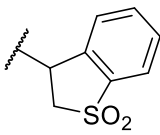
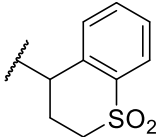
第二章第一節で述べた合成戦略に従い、α_{1D} 活性向上を目的に化合物 **25** のアミン末端部位のベンジル基周辺の SAR を取得した結果を Table 8 に示した。また、LLE の目標

値は、市販薬の平均である 6 以上とした。 α_{1A} 、 α_{1B} および α_{1D} 受容体に対する結合活性に重要な置換基を調べる目的で、3-クロロベンジル誘導体 **28** と 2-メチルスルホニルベンジル誘導体 **29** を合成した。その結果、2-メチルスルホニル基を持つ化合物 **29** は、 α_{1D} 結合活性が向上し、メチルスルホニル基が α_{1D} 結合活性を保持するために重要な置換基であることが判明した。次に、母核構造のフェノキシエチルアミンのアミノ基と末端フェニル基との間のリンカー長について検討を行った。フェネチル誘導体 **34** と 3-フェニルプロピル誘導体 **35** はほぼ同等の活性を示したが、リンカーが長くなるに従いサブタイプ選択性は低下した。この結果は、母核構造のフェノキシエチルアミンのアミノ基と末端フェニル基との間のリンカーをメチレンリンカー (1 原子分) とすることにより、 α_{1A} および α_{1B} 受容体に対して高い選択性を獲得できることを明らかにした。また、これらの結果は、既知の α_1 受容体拮抗薬タムスロシン、シロドシンおよび化合物 **A** が 2 または 3 原子のリンカー長を持ち、 α_{1A} および α_{1B} 受容体とのサブタイプ選択性が低いことと一致する (Figure 21)。次に、ベンジル位にメチル基を導入したフェネチル誘導体 **40a** を合成した結果、大幅な活性の減弱が確認された。メチル基の導入によりメチルスルホニル基との立体反発が生じ、活性発現に不利な立体構造になったと推察される。そこで、筆者は活性発現に重要なメチルスルホニル基をオルト位周辺に固定化することができれば、 α_{1D} 活性発現に好ましい配座となり活性の向上が期待できると仮説を立てた。オルト位とベンジル位を環化したチオクロメン誘導体 **40b** を合成した結果、2-メチルスルホニルベンジル誘導体 **29** と同等の結合活性を示した。一方、ジヒドロベンゾチオフェン誘導体 **30** は、大きく活性が減弱したことから活性発現に必要な配座と異なる位置に固定化されたと考えられる。このことから、高い α_{1D} 受容体結合活性とサブタイプ選択性を維持するためには、スルホニル基の占有する位置が極めて重要であり、好ましい位置に固定化することにより高い活性を示すことが明らかとなった。

Table 8. Affinity towards cloned human α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -ARs and physicochemical properties

of 2-chloro-5-fluorophenoxyethylamine derivatives.



compd	R	K_i (nM) ^a			LLE ^b	clogP
		α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}		
25		1800	1100	17	4.3	3.49
28		>270	>120	65	2.2	5.00
29		>270	>120	4.3	5.7	2.65
34		150	30	8.6	5.2	2.84
35		50	44	9.1	4.8	3.22
40a		>270	>120	>94	—	2.96
30		>270	>120	>94	—	2.92
40b		>270	>120	3.9	5.2	3.17

^aK_i value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

^bLLE = -log(K_i)-clogP.

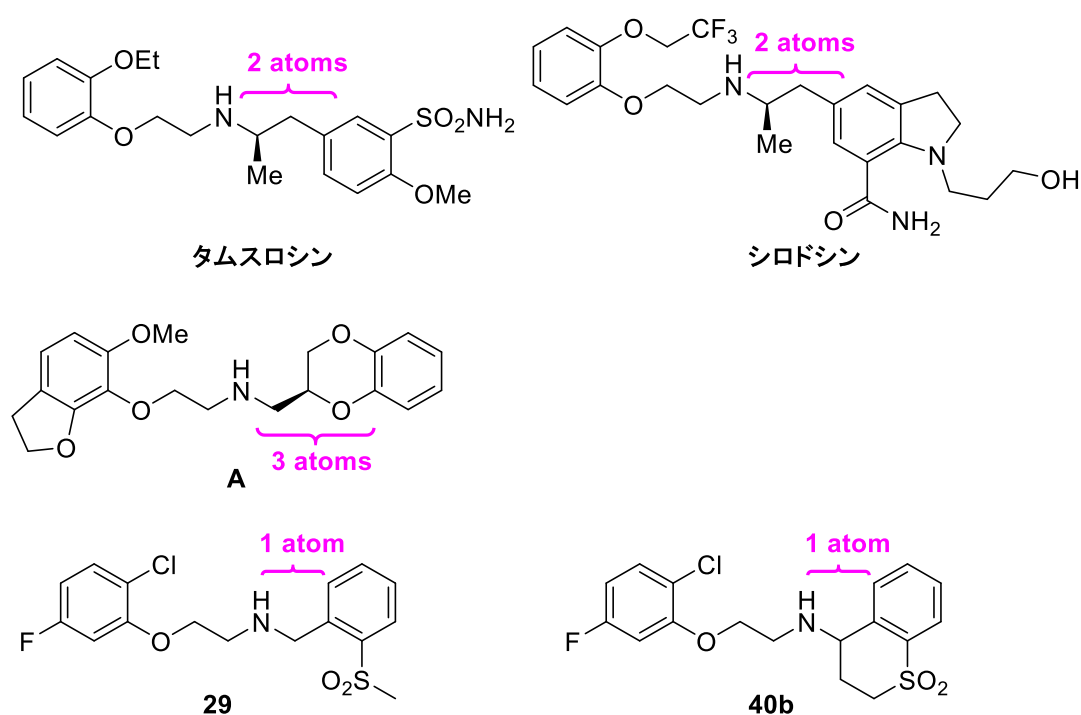


Figure 21. Linker length at the amine residue of Tamsulosin, Silodosin, A, **29** and **40b**.

Table 8 の結果から、α_{1A} および α_{1B} 受容体に対して高いサブタイプ選択性を示すためにはリンカーの長さを適切に選択すること、α_{1D} 受容体に対して強い活性を保持するためには環化によりスルホニル基を適切な位置に導入する立体の固定化が有効なアプローチであることが明らかとなった。次に、Table 8 で最も高い結合活性と LLE 値を持ったチオクロメン誘導体 **40b** について、尿道頸部閉塞ラットの摘出膀胱筋を用いた *in vitro*

によるフェニレフリン誘発膀胱収縮作用の抑制効果を調べた (Table 9)。化合物 **40b** は、化合物 **25** よりも 4.6 倍高い膀胱収縮抑制効果を示した。

Table 9. Evaluation of the selected compounds.

comp	α_{1D} Ki (nM) ^a	phenylephrine-induced contraction ^c , IC ₃₀ (nM) ^d
25	17	250 [43–1400]
40b	3.9	54 [18–170]

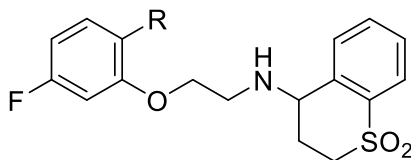
^aKi value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

^bEffects on the phenylephrine-induced contractions of the bladder strips taken from the rats with BOO (n = 2–11).

^cNumbers in brackets represent 95% confidence interval.

続いて化合物 **40b** の in vitro ADMET プロファイルを調べた。Table 10 に示したように、化合物 **40b** はヒト代謝安定性が 78 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ および CYP3A4 阻害率が 52.3%を示した。したがって、薬物動態の低下や薬物相互作用に対して悪影響を与える可能性があるため、改善が必要であることが判明した。そこで、脂溶性を低減した置換基を導入すれば上述した 2 つのプロファイルの改善が期待できると考え、2,5-ジフルオロフェノキシ基を持つ化合物 **41b** を評価した結果、化合物 **40b** よりも Ki 値が大きくなるものの LLE 値を保持したままヒト代謝安定性と CYP3A4 阻害作用が改善した。したがって、化合物 **41b** を用いて更なる最適化検討を行い、活性の向上を目指した。

Table 10. Profiles of **40b** and **41b**.



comp.	R	α_{1D} K_i (nM) ^a	LLE ^b	clogP	Cl _{int} (human) (μ L/min/mg)	CYP3A4 (%inh. at 10 μ M)
40b	Cl	3.9	5.2	3.17	78	52.3
41b	F	17	5.1	2.63	44	26.5

^a K_i value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

^bLLE = $-\log(K_i) - \text{clogP}$.

第四節 活性コンフォメーションに関する考察

Table 8 と Table 9 で見出した化合物 **30**、**40a** および **40b** の間で活性差が生じた要因について、安定構造から考察した。安定構造は、Schrödinger 社 Maestro の MacroModel (ver11.8) で OPLS3 力場を用いて水中での配座を算出した。Figure 22 に 3 つの化合物の安定構造を示した。強い活性を示した化合物 **40b** は、フェノキシエチルアミン側鎖が 2-メチルスルホニルフェニル基に対してエクアトリアル方向に位置している一方で、活性が大きく減弱した化合物 **30** と **40a** はアキシアル方向に側鎖が配置していた。ジヒドロベンゾチオフェン誘導体 **30** は、フェノキシエチルアミノ基とスルホニル基との間で立体反発を避けるため、下図の配座が安定構造になったと考えた。ベンジル位にメチル基を持つ化合物 **40a** は、ベンジル位のメチル基とメチルスルホニル基との間の立体反発

により、フェノキシエチルアミン側鎖が化合物 **30** と同じ方向を向く配座が安定になったと考えられる。これらの立体配座が活性発現に不利であると推察した。

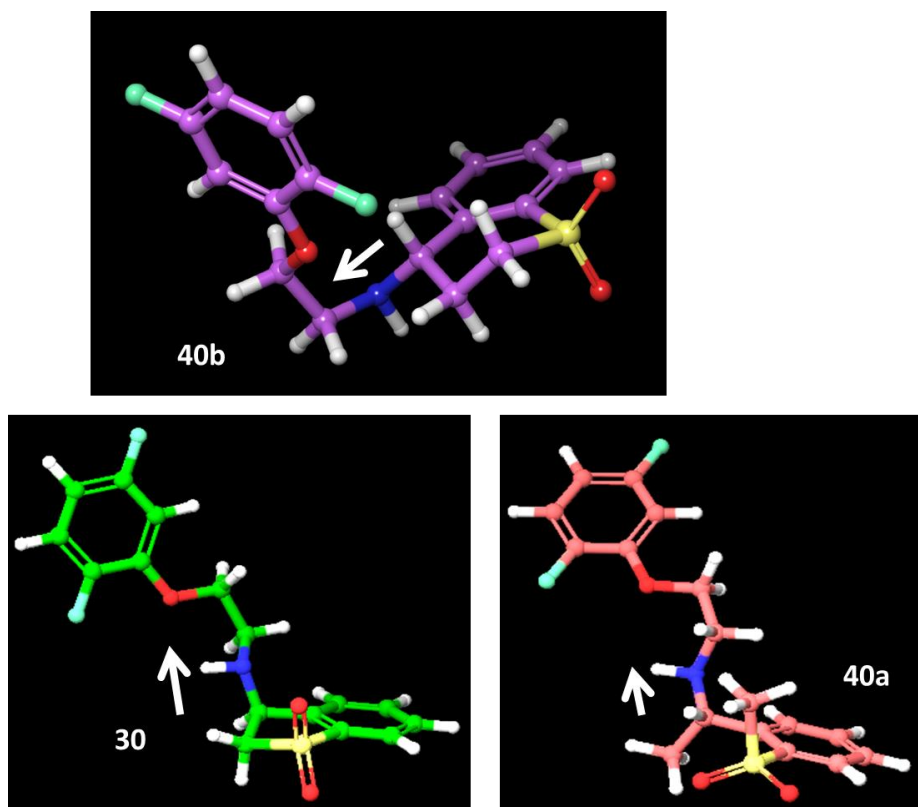


Figure 22. **30**、**40a** と **40b** の安定構造

第五節 高活性および高選択的なフェノキシエチルアミンの創出

第二章第三節で見出した化合物 **41b** の活性向上を目的として、チオクロメン環上への置換基効果を検討した (Table 11)。Table 10 の結果から脂溶性を低減させるとプロファイルを改善できることが明らかとなったことから、大幅に脂溶性を増大させない構造変換を実施した。まず、脂溶性増大に伴う代謝安定性の低下、CYP3A4 阻害作用の増強を回避するため、脂溶性を大幅に増加させない置換基としてメトキシ基を導入し、各置換位置について活性への影響を調べた。5 位と 6 位に導入した場合 (化合物 **41c**、**55a**)、

活性が向上し、7 位または 8 位（化合物 **55b**、**55c**）では低下することがわかった。特に、6-メトキシ誘導体 **55a** は、化合物 **41b** よりも 10 倍活性が向上し、チオクロメン環の 6 位への置換基導入が活性向上に最も有効であることを見出した。次に、メトキシ基よりも脂溶性が低下する種々の置換基を 6 位に導入して活性を調べた。フルオロ基（**56**）、メチルスルホニル基（**57**）およびカルボキサミド基（**58**）が置換した誘導体は、6-メトキシ誘導体 **55a** より活性が低下した。メチルアミノ基を有する誘導体 **59** は、化合物 **55a** に比べヒト代謝安定性や CYP3A4 阻害作用を悪化させることなく活性が 2 倍向上し、LLE 値が目標とする 6 以上に到達した。以上の検討から、ヒト代謝安定性が高く、CYP3A4 阻害作用の低い、強力な活性を持つ選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬 **59** を見出すことに成功した。

Table 11. Affinity for cloned human α_1 -AR and physicochemical properties for (2,5-di-fluorophenoxyethyl)thiochroman-4-amine 1,1-dioxide derivatives.

compd	R	α_{1D} K_i^a (nM)	LLE ^b	clogP	Clint (human) (μ L/min/mg)	CYP3A4 (%inh. at 10 μ M)
41b	H	17	5.1	2.63	44	26.5
41c	5-OMe	9.5	5.0	2.98	87	28.6
55a	6-OMe	1.5	5.8	2.98	53	22.7
55b	7-OMe	38	4.4	2.98	71	34.3
55c	8-OMe	170	3.8	2.98	34	17.1
56	6-F	12	5.0	2.90	39	23.1
57	6-SO ₂ Me	310	4.9	1.62	11	5.2
58	6-CONH ₂	86	5.4	1.71	19	12.5
59	6-NHMe	0.85	6.2	2.89	45	26.1

^aK_i value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

$$^b\text{LLE} = -\log(K_i) - \text{clogP}.$$

化合物 **59** の光学活性体についてサブタイプ選択性と薬理作用を評価した (Table 12)。化合物 **59** は、α_{1A} および α_{1B} に対して 400 倍以上のサブタイプ選択性を示し、IC₃₀ 値が 80 nM で膀胱収縮を抑制した。続いて、2 つのエナンチオマーに関して検討した結果、*S* 体がユートマーであることが明らかになり、ユートマーは高い選択性および膀胱収縮抑制作用を示した。さらに、化合物(*S*)-**59** は、第二章で見出した **5u** と比べて同等の結合活性、サブタイプ選択性および in vitro 膀胱収縮抑制作用を持つことも確認された。

Table 12. In vitro biochemical activity profile of **59**.

compd	K _i (nM) ^a			LLE ^b	Selectivity		phenylephrine-induced contraction ^c , IC ₃₀ (nM) ^d	Clint (human) (μL/min/mg)	CYP3A4 (%inh. at 10 μM)
	α _{1A}	α _{1B}	α _{1D}		1A/1D	1B/1D			
59	350	430	0.85	6.2	410	510	80 [6.7–970]	45	26.1
(<i>R</i>)- 59	1200	>1200	62	4.3	19	>20	–	59	26.7
(<i>S</i>)- 59	130	150	0.30	6.6	430	500	5.5 [3.0–10]	45	20.7
5u	220	880	1.1	8.7	200	800	12 [5.6–19]	1	-1.9

^aK_i value for α_{1D} was obtained by displacement of 7-methoxy-[³H]-prazosin from cloned human receptor.

$$^b\text{LLE} = -\log(K_i) - \text{clogP}.$$

^cEffects on the phenylephrine-induced bladder contractions in rats with BOO (n = 7 – 8).

^dNumbers in brackets represent 95% confidence interval.

第六節 まとめ

本章では、既存の α_1 受容体拮抗薬が有するフェノキシエチルアミン構造に着目した社内ライブラリを抽出し、ヒット化合物を見出す手法を取ることで、選択的 α_{1D} 受容体拮抗薬を創出した過程について述べた。既存の α_1 受容体拮抗薬の情報から、 α_{1D} 受容体に対する活性および選択性向上を目的に、ヒット化合物 **25** のベンジルアミン部位の最適化研究を実施した。その結果、選択的に α_{1D} 受容体を阻害するため以下に示した重要な部分構造を見出した。サブタイプ選択性を保持するためには、フェノキシエチルアミノ基とベンゼン環との間のリンカーを適切な長さに調節することが重要であることを明らかにした。活性の保持には、ベンジルアミン部位に置換したメチルスルホニル基が重要であり、スルホニル基を固定化したチオクロメン骨格は、最も強力な活性を示すことが明らかになった。さらなる活性向上を目的としてチオクロメンのベンゼン環上へ置換基導入を実施した結果、第二章で見出したイミノピリジン系化合物 **5u** と同等の高いサブタイプ選択性と活性を有する化合物(*S*)-**59** を創出した。

Experimental Section

General procedure for the preparation of compounds **25**, **28–30**.

A mixture of **27** (0.540 g, 2.15 mmol), benzylamine (1.95 mmol) and K₂CO₃ (4.88 mmol) in EtOH (20 mL) was stirred for 24 h at 90 °C, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on NH silica gel (AcOEt/ hexane) to give **25** and **28–30** as free bases. The free bases of **25** and **28–30** were then dissolved in EtOH (1 mL) and 4 M HCl in AcOEt (1 mL) was added. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from EtOH and Et₂O to give **25**, **28–30**.

2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)-N-[5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl]ethanamine

hydrochloride (25). Yield 8%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.33 (s, 3H), 3.52 (br. s, 2H), 4.45 (t, 2H, *J* = 4.7 Hz), 4.67 (br. s, 2H), 6.90 (td, 1H, *J* = 8.4, 2.8 Hz), 7.22 (dd, 1H, *J* = 10.6, 2.7 Hz), 7.51 (dd, 1H, *J* = 8.7, 6.1 Hz), 7.76–7.90 (m, 1H), 7.96–8.11 (m, 2H), 9.45 (br. s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 45.0, 46.6, 47.6, 65.6, 103.0, 109.2, 117.5, 130.5, 131.3, 132., 133.0, 133.9, 138.9, 139.2, 154.6, 160.4. Mp 180–182 °C. Anal. Calcd for C₁₆H₁₇Cl₃FNO₃S: C, 44.82; H, 4.00; N, 3.27. Found: C, 44.85; H, 4.16; N, 3.23. LC–MS (ESI) *m/z*: 393.1 [M+H⁺–(HCl)].

2-(2-Bromoethoxy)-1-chloro-4-fluorobenzene (27). A mixture of **26** (25.0 g, 0.171 mol) and 1,2-dibromoethane (64.1 g, 0.341 mol) in 1 M NaOH (171 mL) was stirred for 16 h at 90 °C and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:10) to give the title compound (16.7 g, 39%) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.59–3.76 (m, 2H), 4.32 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 6.59–6.75 (m, 2H), 7.32 (dd, 1H, *J* = 5.9 Hz).

***N*-(3-Chlorobenzyl)-2-(2-chloro-5-fluorophenoxy)ethanamine hydrochloride (28).** Yield 10%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.38 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 4.31 (s, 2H), 4.44 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.89 (td, 1H, *J* = 8.5, 3.0 Hz), 7.21 (dd, 1H, *J* = 10.6, 2.7 Hz), 7.40–7.59 (m, 4H), 7.71 (s, 1H), 9.59 (br. s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 44.9, 49.7, 65.1, 102.5, 108.7, 116.9, 128.9, 130.0, 130.5, 130.8, 133.1, 134.4, 154.1, 160.3, 162.7. Mp 165–166 °C. Anal. Calcd for C₁₅H₁₅Cl₃FNO: C, 51.38; H, 4.31; N, 3.99. Found: C, 51.37; H, 4.28; N, 3.84. LC–MS (ESI) *m/z*: 314.0 [M+H⁺–(HCl)].

2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)-*N*-[2-(methylsulfonyl)benzyl]ethanamine (29). Yield 21%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.14 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 3.29 (s, 3H), 4.06–4.18 (m, 2H), 4.31 (s, 2H), 6.59–6.71 (m, 2H), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.5, 5.9 Hz), 7.43–7.52 (m, 1H), 7.54–7.66 (m, 2H), 8.09 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz). NH proton was not observed. ¹³C NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 44.53, 47.30, 49.61, 68.90, 102.08, 107.81, 116.70, 127.80, 129.03, 130.48, 131.40, 133.56, 138.95, 154.90, 159.90, 163.12. LC–MS (ESI) m/z : 358.0 [M+H⁺].

***N*-[2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-2,3-dihydro-1-benzothiophen-3-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (30). Yield 4%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.29–3.45 (m, 1H), 3.46–3.62 (m, 1H), 3.89–4.10 (m, 1H), 4.17–4.34 (m, 1H), 4.47 (br. s, 2H), 5.33–5.62 (m, 1H), 6.89 (dt, 1H, J = 2.6, 8.5 Hz), 7.22 (dd, 1H, J = 10.9, 2.6 Hz), 7.50 (dd, 1H, J = 8.7, 6.0 Hz), 7.69–8.05 (m, 3H), 8.09–8.32 (m, 1H), 9.60–11.17 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 43.7, 52.1, 53.5, 64.9, 102.4, 108.6, 116.7, 121.2, 127.7, 130.7, 131.5, 134.2, 139.6, 154.0, 160.2, 162.6. Mp 219–222 °C. LC–MS (ESI) m/z : 356.1 [M+H⁺–(HCl)].

***N*-[2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-2-[2-(methylsulfonyl)phenyl]acetamide (32).** A

mixture of **31** (1.24 g, 5.49 mmol), 2-[2-(methylsulfonyl)phenyl]acetic acid (1.00 g, 5.49 mmol), WSC (1.26 g, 6.59 mmol), HOBt (1.01 g, 6.59 mmol) and Et₃N (0.830 g, 8.23 mmol) in DMF (20 mL) was stirred for 14 h at 60 °C, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with 1 M HCl, aqueous NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. To a solution of the residue in AcOEt (50 mL) was added 70 % *m*CPBA (2.91 g, 11.8 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and poured into aqueous sodium thiosulfate. The separated organic layer was washed with aqueous NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo to give the title compound

(1.28 g, 62%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.12 (s, 3H), 3.67 (q, 2H, *J* = 5.3 Hz), 4.00–4.07 (m, 4H), 6.58–6.75 (m, 3H), 7.27–7.33 (m, 1H), 7.43–7.63 (m, 3H), 8.05 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz). Mp 165–167 °C. LC–MS (ESI) *m/z*: 386.0 [M+H⁺].

***N*-[2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-3-[2-(methylsulfonyl)phenyl]propanamide**

(33). A mixture of **31** (0.990 g, 4.38 mmol), 3-[2-(methylsulfonyl)phenyl]propanoic acid (1.00 g, 4.38 mmol), WSC (1.09 g, 5.69 mmol), HOBt (0.870 g, 5.69 mmol), and Et₃N (0.89 g, 8.76 mmol) in DMF (20 mL) was stirred for 3 days at 50 °C, poured into 1 M HCl and extracted with AcOEt. The extract was washed with aqueous NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo to give the title compound (1.35 g, 77%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.59–2.68 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.26–3.36 (m, 2H), 3.69 (q, 2H, *J* = 5.3 Hz), 4.03 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.19 (br. s, 1H), 6.60–6.70 (m, 2H), 7.27–7.43 (m, 3H), 7.47–7.55 (m, 1H), 8.00 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz). Mp 96–97 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₁₉ClFNO₄S: C, 54.07; H, 4.79; N, 3.50. Found C, 54.04; H, 4.73; N, 3.37. LC–MS (ESI) *m/z*: 400.1 [M+H⁺].

2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)-*N*-{2-[2-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl}ethanamine (34).

To a solution of **32** (1.00 g, 2.59 mmol) in THF (50 mL) was added 1 M BH₃ in THF (9 mL) at 0 °C. After stirring at 80 °C for 4 h, the reaction was quenched with ice. The whole was added to 1 M HCl and stirred at 80 °C for 14 h. The mixture was cooled to room temperature and diluted with AcOEt. The aqueous layer was basified by 8 M NaOH and extracted with AcOEt

and THF. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo to give the title compound (80.0 mg, 8%) as a colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.03–3.16 (m, 7H), 3.21–3.30 (m, 2H), 4.10 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.58–6.71 (m, 2H), 7.24–7.32 (m, 1H), 7.36–7.47 (m, 2H), 7.53–7.63 (m, 1H), 8.05 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 33.3, 44.8, 48.0, 51.2, 69.8, 102.7, 108.3, 117.3, 127.3, 129.1, 131.0, 132.5, 134.0, 139.5, 140.5, 155.5, 162.0. LC–MS (ESI) *m/z*: 372.1 [M+H⁺].

***N*-[2-(2-chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-3-[2-(methylsulfonyl)phenyl]propan-1-amine**

(35). The title compound was prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **34**. Yield 5%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.87–2.02 (m, 2H), 2.82 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.03–3.16 (m, 7H), 4.11 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.57–6.73 (m, 2H), 7.27–7.32 (m, 1H), 7.34–7.45 (m, 2H), 7.51–7.60 (m, 1H), 7.99–8.08 (m, 1H). ¹³C NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ 29.8, 31.7, 44.2, 47.7, 48.7, 69.3, 102.2, 107.8, 116.7, 126.6, 128.6, 130.5, 131.7, 133.5, 138.7, 142.0, 155.0, 161.5. LC–MS (ESI) *m/z*: 386.1 [M+H⁺].

General procedure for the preparation of compounds 38 and 39.

A mixture of amine (1.30 mmol), **36** or **37** (1.30 mmol), WSC (1.95 mmol), HOBt (1.95 mmol) and Et₃N (2.60 mmol) in CH₃CN (5 mL) was stirred for 2 h at room temperature, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and

concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/ hexane) to afford **38** and **39**, respectively.

2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)-N-{1-[2-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl}acetamide (38a).

Amine **43** was used as a reactant. Yield 91%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.59 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz), 3.44 (s, 3H), 4.35–4.60 (m, 2H), 5.75–5.88 (m, 1H), 6.65 (dd, 1H, *J* = 9.6, 2.8 Hz), 6.73–6.82 (m, 1H), 7.37–7.49 (m, 4H), 7.56–7.65 (m, 1H), 8.01–8.08 (m, 1H). LC–MS (ESI) *m/z*: 386.0 [M+H⁺].

2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)-N-(1,1-dioxido-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-yl)aceta

mide (38b). Yield 89%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.59–2.87 (m, 2H), 3.39–3.57 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 5.49 (td, 1H, *J* = 8.4, 5.1 Hz), 6.65–6.80 (m, 2H), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8.9, 5.8 Hz), 7.39–7.46 (m, 1H), 7.51–7.62 (m, 2H), 7.90–8.02 (m, 1H). Mp 120–121 °C. Anal. Calcd for C₁₇H₁₅ClFNO₄S: C, 53.20; H, 3.94; N, 3.65. Found: C, 53.31; H, 4.03; N, 3.65. LC–MS (ESI) *m/z*: 382.0 [M–H⁺].

2-(2,5-Difluorophenoxy)-N-(1,1-dioxido-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-yl)acetamide

(39b). Yield 85%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.57–2.84 (m, 2H), 3.36–3.57 (m, 2H), 4.54–4.68 (m, 2H), 5.50 (td, 1H, *J* = 8.3, 5.3 Hz), 6.65–6.78 (m, 2H), 7.00–7.14 (m, 2H), 7.34–7.43 (m, 1H), 7.48–7.64 (m, 2H), 7.91–8.01 (m, 1H). LC–MS (ESI) *m/z*: 368.0 [M+H⁺].

2-(2,5-Difluorophenoxy)-N-(5-methoxy-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-yl)

acetamide (39c). Amine **50** was used as a reactant. Yield 89%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.70–2.80 (m, 2H), 3.25–3.35 (m, 1H), 3.45–3.60 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 4.50 (d, 1H, *J* = 14.7 Hz), 4.58 (d, 1H, *J* = 14.7 Hz), 5.54 (quin, 1H, *J* = 3.5 Hz), 6.64–6.76 (m, 3H), 6.96–7.10 (m, 2H), 7.49–7.56 (m, 2H). LC–MS (ESI) *m/z*: 396.0 [M–H⁺].

General procedure for the preparation of compounds 40 and 41.

To a solution of **38** or **39** (1.14 mmol) in THF (5 mL) was added 1 M BH₃ in THF (3.40 mL) at 0 °C. After stirring at 70 °C for 2 h, the reaction was quenched with ice. The whole was added to 1 M HCl and stirred at 70 °C for 2 h. The mixture was cooled to room temperature and diluted with AcOEt. The aqueous layer was basified by 8 M NaOH and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄, and concentrated in vacuo. To the residue was added 4 M HCl in AcOEt at room temperature. The resulting precipitate was filtered off and washed with diisopropyl ether to give **40** or **41**.

N-[2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-1-[2-(methylsulfonyl)phenyl]ethanamine

hydrochloride (40a). Yield Quant. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.97 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 3.12–3.20 (m, 3H), 3.25–3.60 (m, 2H), 4.32–4.62 (m, 2H), 5.52–5.70 (m, 1H), 6.58–6.76 (m, 2H), 7.22–7.36 (m, 1H), 7.54–7.67 (m, 1H), 7.75–7.89 (m, 1H), 8.00–8.17 (m, 1H), 8.33–8.47 (m, 1H), 9.67–9.94 (m, 1H), 10.80–11.05 (m, 1H). ¹³C NMR (76 MHz, DMSO-*d*₆) δ 19.9, 44.7,

53.0, 59.7, 64.9, 102.5, 108.6, 116.9, 128.6, 129.5, 130.7, 134.7, 137.0, 139.0, 154.1, 159.8, 163.0. LC–MS (ESI) m/z : 372.1 $[M+H^+-(HCl)]$.

***N*-[2-(2-Chloro-5-fluorophenoxy)ethyl]-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (40b). Yield 9%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.84 (br. s, 2H), 3.48–3.96 (m, 4H), 4.43 (br. s, 2H), 4.95 (br. s, 1H), 6.81–6.95 (m, 1H), 7.22 (dd, 1H, $J = 10.4$, 2.5 Hz), 7.52 (dd, 1H, $J = 8.7$, 6.1 Hz), 7.76 (br. s, 2H), 7.93 (br. s, 2H), 9.60 (br. s, 2H). ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ 22.5, 43.1, 45.2, 52.5, 65.0, 102.4, 108.6, 116.8, 123.5, 130.6, 132.8, 139.5, 154.2, 158.7, 159.1, 159.8, 163.1. Mp 193–194 °C. Anal. Calcd for $C_{17}H_{18}Cl_2FNO_3S$: C, 50.25; H, 4.47; N, 3.45. Found: C, 50.01; H, 4.66; N, 3.45. LC–MS (ESI) m/z : 370.0 $[M+H^+-(HCl)]$.

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide**

hydrochloride (41b). Yield 74%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2.67–2.95 (m, 2H), 3.46–3.58 (m, 2H), 3.59–3.74 (m, 1H), 3.82–4.01 (m, 1H), 4.32–4.51 (m, 2H), 4.83–5.01 (m, 1H), 6.76–6.91 (m, 1H), 7.15–7.38 (m, 2H), 7.65–7.82 (m, 2H), 7.84–8.03 (m, 2H), 9.47–9.95 (m, 2H). ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ 22.5, 43.2, 45.2, 52.6, 64.8, 103.2, 107.2, 116.6, 123.4, 130.7, 130.7, 132.7, 139.6, 146.4, 149.7, 156.6, 159.8. Mp 153–156 °C. Anal. Calcd for $C_{17}H_{18}ClF_2NO_3S$: C, 52.38; H, 4.65; N, 3.59. Found: C, 52.30; H, 4.75; N, 3.56. LC–MS (ESI) m/z : 354.1 $[M+H^+-(HCl)]$.

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-5-methoxy-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (41c). Yield 66%. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.60–2.80 (m, 1H), 2.85–3.00 (m, 1H), 3.50–3.70 (m, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.18–4.36 (m, 1H), 4.36–4.60 (m, 2H), 4.80–4.95 (m, 1H), 6.80–6.90 (m, 1H), 7.20–7.38 (m, 2H), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.72 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz), 8.64 (br. s, 1H), 9.92 (br. s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.8, 44.4, 44.9, 48.5, 56.4, 64.8, 103.2, 107.2, 114.4, 115.1, 116.6, 118.5, 132.4, 140.0, 146.4, 148.1, 156.9, 158.3. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀ClF₂NO₄S: C, 51.49; H, 4.80; N, 3.34. Found C, 51.60; H, 4.82; N, 3.37. LC–MS (ESI) *m/z*: 384.1 [M+H⁺–(HCl)].

1-[2-(Methylsulfonyl)phenyl]ethanamine hydrochloride (43). A mixture of **42** (5.11 g, 25.8 mmol) and MeONH₂·HCl (2.80 g, 33.5 mmol) in pyridine (30 mL) was stirred overnight at room temperature, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with 1 M HCl and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. To a solution of the residue in THF (100 mL) was added 1 M BH₃ in THF (75 mL) at 0 °C. After stirring at 80 °C for 4 h, the mixture was cooled to room temperature and 1 M HCl (120 mL) was added. After stirring at 80 °C for 2 h, the mixture was cooled to room temperature and diluted with AcOEt. The separated aqueous layer was basified with 8 M NaOH and extracted with AcOEt and THF. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in MeOH and 4 M HCl in AcOEt (20 mL) was added. The resulting precipitate was

filtered off and washed with AcOEt to give the title compound (1.35 g, 22%) as a colorless solid.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.55 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 3.36 (s, 3H), 5.21 (br. s, 1H), 7.63–7.72 (m, 1H), 7.83–7.91 (m, 1H), 7.97–8.06 (m, 2H), 8.68 (br. s, 3H). Mp 238–240 °C. LC–MS (ESI) m/z : 200.0 $[\text{M}+\text{H}^+-(\text{HCl})]$.

3-[(2-Bromo-5-fluorophenyl)sulfanyl]propionic acid (45). A mixture of **44** (2.38 g, 11.5 mmol) and 8 M NaOH (1.80 mL) in H_2O (5.80 mL) was stirred at room temperature for 10 min. To the mixture was added a solution of 3-bromopropionic acid (1.76 g, 11.5 mmol) and K_2CO_3 (0.80 g, 5.79 mmol) in H_2O (5.30 mL) at room temperature, and the mixture was stirred at room temperature for 5 days. The reaction mixture was acidified by 1 M HCl, and extracted with AcOEt. The extract was washed with H_2O and brine, dried with MgSO_4 and concentrated to provide the title compound (3.18 g, 11.4 mmol, 99%) as a pale solid, which was collected with hexane. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.77 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 3.20 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 6.74–6.81 (m, 1H), 6.98 (dd, 1H, J = 9.0, 2.7 Hz), 7.49 (dd, 1H, J = 8.4, 5.1 Hz), 7.62 (dd, 1H, J = 9.0, 5.4 Hz). Mp 124–126 °C.

8-Bromo-5-fluoro-2,3-dihydro-4H-thiochromen-4-one (46). A mixture of **45** (2.0 g, 7.17 mmol) in conc. H_2SO_4 (20 mL) was stirred at room temperature for 30 min and poured into ice and H_2O . The product was extracted with AcOEt and the extract was washed with H_2O and brine, dried with MgSO_4 and concentrated in vacuo. The residue was purified by column

chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 19:1–4:1) to provide the title compound (692 mg, 37%) as a brown solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.95–3.00 (m, 2H), 3.23–3.28 (m, 2H), 6.78 (dd, 1H, J = 10.8, 8.7 Hz), 7.60 (dd, 1H, J = 9.0, 4.8 Hz). Mp 102–104 °C. LC–MS (ESI) m/z : 258.8 $[\text{M}-\text{H}^+]$.

8-Bromo-5-fluoro-2,3-dihydro-4H-thiochromen-4-one 1,1-dioxide (47). To a solution of **46** (0.620 g, 2.38 mmol) in AcOEt (20 mL) was added *m*CPBA (1.17 g, 4.75 mmol) at 0 °C, and the mixture was stirred at room temperature for 14 h and poured into aqueous NaHCO_3 . The separated organic layer was washed with aqueous NaHCO_3 and brine, dried with MgSO_4 and concentrated to provide the title compound (0.630 g, 91%) as a colorless solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.35–3.39 (m, 2H), 3.74–3.79 (m, 2H), 7.27 (dd, 1H, J = 10.2, 8.7 Hz), 7.94 (dd, 1H, J = 9.0, 4.5 Hz). Mp 162–165 °C.

5-Fluoro-2,3-dihydro-4H-thiochromen-4-one 1,1-dioxide (48). A mixture of **47** (1.00 g, 3.41 mmol) and Pd/C (0.500 g) in EtOH (100 mL) was stirred at room temperature for 14 h under H_2 atmosphere. The mixture was filtrated through Celite and concentrated in vacuo. The precipitate was collected by diisopropyl ether to provide the title compound (713 mg, 98%) as a colorless solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.37–3.42 (m, 2H), 3.67–3.71 (m, 2H), 7.44 (ddd, 1H, J = 9.6, 8.1, 1.8 Hz), 7.76–7.87 (m, 2H). Mp 140–141 °C.

5-Fluoro-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide (49). A mixture of **48** (577 mg, 2.69 mmol) and MeONH₂·HCl (292 mg, 3.50 mmol) in pyridine (5 mL) was stirred at room temperature for 14 h. The mixture was poured into 1 M HCl and extracted with ethyl acetate. The separated organic layer was washed with 1 M HCl and water, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:9–1:2) to provide a white powder. To a solution of the obtained powder in THF (5 mL) was added 1 M BH₃ in THF (13.4 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred at 80 °C for 1.5 h, and then the reaction mixture was allowed to reach room temperature and 1 M HCl (27 mL) was added. The mixture was stirred at 80 °C for 1 h, cooled to room temperature, basified with 8 M NaOH (4 mL) and extracted with AcOEt. The extract was washed with water, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:1–7:3, then MeOH/AcOEt = 1:19) to provide the title compound (420 mg, 73%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.35–2.42 (m, 1H), 2.74–2.88 (m, 1H), 3.24 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 6.3, 2.4 Hz), 3.80–3.92 (m, 1H), 4.55 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz), 7.23–7.30 (m, 1H), 7.48 (dt, 1H, *J* = 8.1, 5.1 Hz), 7.74 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz). Mp 122–124 °C. LC–MS (ESI) *m/z*: 216.0 [M+H⁺].

5-Methoxy-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide (50). To a mixture of **49** (500 mg, 2.32 mmol) in MeOH (15 mL) was slowly added sodium (533 mg, 23.2 mmol) at room temperature and then the mixture was stirred at 95 °C for 14 h and poured into aqueous NH₄Cl and AcOEt. The separated organic layer was washed with aqueous NH₄Cl and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (MeOH/AcOEt = 1:19–1:9) to provide the title compound (222 mg, 42%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.30–2.40 (m, 1H), 2.70–2.85 (m, 1H), 3.21 (ddd, 1H, *J* = 8.7, 6.0, 2.7 Hz), 3.77 (dt, 1H, *J* = 13.5, 3.0 Hz), 3.91 (s, 3H), 4.47 (t, 1H, *J* = 4.1 Hz), 7.04 (dd, 1H, *J* = 7.8, 0.9 Hz), 7.44 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.2 Hz).

6-Bromo-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide hydrochloride (52a). A mixture of **51a** (150 mg, 0.620 mmol) and MeONH₂·HCl (67.0 mg, 0.800 mmol) in pyridine (1.50 mL) was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was concentrated in vacuo and poured into water and ethyl acetate. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:99–1:9) to provide an oxime (140 mg, 83%). To a mixture of the oxime (140 mg, 0.520 mmol) in THF (1 mL) was slowly added 1 M BH₃ in THF (1.30 mL, 1.30

mmol) at 0 °C. The mixture was stirred at 60 °C for 4 h, and then the mixture was allowed to reach room temperature, and MeOH was added. The obtained solution was concentrated and cooled to 0 °C. To the residue was slowly added 6 M HCl, and the mixture was stirred at 70 °C for 2 h. The mixture was allowed to reach room temperature, and then 8 M NaOH was added. The mixture was extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in AcOEt (1 mL) and Boc₂O (112 mg, 0.520 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 3:97–3:17) to provide an *N*-Boc protected product (82.5 mg, 47%). The product (76.1 mg, 0.220 mmol) was dissolved in AcOEt (1 mL), and 70% *m*CPBA (109 mg, 0.440 mmol) was added at 0°C. The mixture was stirred for 3 h at room temperature and aqueous sodium thiosulfate was added. The mixture was extracted with AcOEt. The extract was washed with aqueous NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:4–3:2) to provide a sulfonyl product. The product was treated with 4 M HCl in AcOEt (1 mL) and then concentrated in vacuo. The resulting precipitate was collected by filtration and washed with AcOEt to provide the title compound (55.9 mg, 81%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.53–2.82 (m,

2H), 3.65–3.77 (m, 1H), 3.78–3.91 (m, 1H), 4.80 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.79–7.93 (m, 2H), 8.17 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 8.96 (br. s, 3H). Mp 281–283 °C. LC–MS (ESI) m/z : 276.2 $[M+H^+-(HCl)]$.

7-Bromo-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide hydrochloride (52b). The title compound was prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **52a**. Yield 70%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.56–2.69 (m, 1H), 2.69–2.83 (m, 1H), 3.67–3.80 (m, 1H), 3.83–3.96 (m, 1H), 4.77 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.85–7.91 (m, 1H), 7.97–8.02 (m, 2H), 9.09 (br. s, 3H). LC–MS (ESI) m/z : 276.2 $[M+H^+-(HCl)]$.

8-Bromo-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide hydrochloride (52c). The title compound was prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **52a**. Yield 62%. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.53–2.64 (m, 1H), 2.65–2.78 (m, 1H), 3.68–3.79 (m, 1H), 3.81–3.93 (m, 1H), 4.81 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.56–7.65 (m, 1H), 7.85–7.95 (m, 2H), 9.07 (br. s, 2H). LC–MS (ESI) m/z : 276.2 $[M+H^+-(HCl)]$.

6-Fluoro-3,4-dihydro-2H-thiochromen-4-amine 1,1-dioxide hydrochloride (52d). The title compound was prepared in a manner similar to that described for the synthesis of **52a**. Yield 32%. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.55–2.84 (m, 2H), 3.61–3.91 (m, 2H), 4.81 (s, 1H), 7.43–7.64 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.99 (dd, 1H, $J = 5.7, 8.9$ Hz), 8.95 (3H, s). LC–MS (ESI) m/z : 216.1 $[M+H^+-(HCl)]$.

tert-Butyl

(6-bromo-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-yl)

[2-(2,5-difluorophenoxy)ethyl] carbamate (**54a**). A mixture of **52a** (6.68 g, 21.4 mmol), **37** (4.42 g, 23.5 mmol), WSC (4.50 g, 23.5 mmol), HOBt (3.18 g, 23.5 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (6.08 g, 47.0 mmol) in DMF (50 mL) was stirred for 3 h at room temperature, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with water and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 7:13–1:1) to give the amide (8.19 g, 86%). To a solution of the product (8.19 g, 18.4 mmol) in THF (20 mL) was added dropwise 1 M BH₃ in THF (45.9 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at 65 °C for 2 h, and then the reaction mixture was allowed to reach room temperature and 6 M HCl (25 mL) was slowly added. The mixture was stirred at 75 °C for 2 h, cooled to room temperature, basified with 8 M NaOH and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in AcOEt (36 mL), and Boc₂O (4.00 g, 18.4 mmol) was added. The mixture was stirred for 2 h at 50 °C, cooled to room temperature and concentrated in vacuo. The residue was crystallized from diisopropyl ether to provide the title compound (8.50 g, 87%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.14–1.56 (m, 9H), 2.53–2.70 (m, 1H), 2.94–3.21 (m, 1H), 3.34–3.54 (m, 2H), 3.57–3.81 (m, 1H), 3.91–4.35 (m, 3H), 4.67–5.56 (m, 1H),

6.56–6.77 (m, 2H), 7.02 (ddd, 1H, $J = 10.5, 9.0, 5.3$ Hz), 7.32–7.51 (m, 1H), 7.59 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.78 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz). Mp 173–175 °C. LC–MS (ESI) m/z : 432.1 $[M+H^+]$.

***tert*-Butyl (7-bromo-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-yl)**

[2-(2,5-difluorophenoxy)ethyl] carbamate (54b). The title compound was prepared from **52b** in a manner similar to that described for the synthesis of **54a**. Yield 40%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.15–1.53 (m, 9H), 2.66 (br. s, 1H), 3.12 (br. s, 1H), 3.27–3.63 (m, 3H), 3.64–4.00 (m, 1H), 4.00–4.37 (m, 2H), 4.64–5.54 (m, 1H), 6.55–6.76 (m, 2H), 7.02 (td, 1H, $J = 9.9, 5.1$ Hz), 7.20 (br. s, 1H), 7.61 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.05 (s, 1H). LC–MS (ESI) m/z : 530.0 $[M-H^+]$.

***tert*-Butyl (8-bromo-1,1-dioxido-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-yl)**

[2-(2,5-difluorophenoxy)ethyl] carbamate (54c). The title compound was prepared from **52c** in a manner similar to that described for the synthesis of **54a**. Yield 74%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.07–1.56 (m, 9H), 2.58 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz), 3.07 (br. s, 1H), 3.36–4.38 (m, 6H), 4.50–5.70 (m, 1H), 6.55–6.75 (m, 2H), 7.02 (ddd, 1H, $J = 10.6, 9.1, 5.1$ Hz), 7.13–7.39 (m, 2H), 7.66 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz). LC–MS (ESI) m/z : 530.0 $[M-H^+]$.

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-6-methoxy-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (55a). A mixture of **54a** (1.00 g, 1.88 mmol), Pd_2dba_3 (86.0 mg, 93.9 μmol), potassium hydroxide (316 mg, 5.63 mmol), *t*-BuXPhos (160 mg, 0.38 mmol) in

DME (5 mL) and water (2.5 mL) was stirred at 100 °C for 17 h, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified with column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 3:17–1:1) to provide a coupling product (546 mg, 62%). A mixture of the product (235 mg, 0.500 mmol), iodomethane (46.7 µL, 0.750 mmol) and K₂CO₃ (104 mg, 0.750 mmol) in DMF (2 mL) was stirred for 3 h at room temperature, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with water and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 3:7–3:2) to provide a methoxy product (253 mg). The product and 4 M HCl in AcOEt (2 mL) was stirred for 1 h at room temperature and concentrated in vacuo. The resulting precipitate was filtered off and recrystallized from EtOH, diethyl ether and water to provide the title compound (152 mg, 73%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.79 (br. s, 2H), 3.60 (d, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.76–3.86 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 4.45 (br. s, 2H), 4.89 (br. s, 1H), 6.83 (tt, 1H, *J* = 8.5, 3.2 Hz), 7.16–7.36 (m, 3H), 7.57 (br. s, 1H), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 9.86 (br. s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.5, 43.0, 45.4, 52.7, 56.1, 64.8, 103.2, 107.3, 115.1, 116.6, 116.9, 125.5, 131.5, 132.6, 146.4, 148.1, 158.3, 161.9. Mp 216–218 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀F₂ClNO₄S: C, 51.49; H, 4.80; N, 3.34. Found C, 51.54; H, 4.84; N, 3.31. LC–MS (ESI) *m/z*: 384.1 [M+H⁺–(HCl)].

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-7-methoxy-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (55b). The title compound was prepared from **54b** in a manner similar to that described for the synthesis of **55a**. Yield 66%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.68–2.90 (m, 2H), 3.33–3.55 (m, 3H), 3.64 (br. s., 1H), 3.87 (s, 3H), 4.40 (br. s, 2H), 4.84 (br. s, 1H), 6.78–6.89 (m, 1H), 7.15–7.25 (m, 1H), 7.25–7.39 (m, 3H), 7.83 (br. s., 1H), 9.51 (br. s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.6, 43.1, 45.0, 52.2, 56.0, 64.8, 103.2, 107.3, 107.2, 116.6, 119.1, 122.1, 132.8, 140.8, 146.4, 148.1, 158.2, 160.3. Mp 219–221 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀ClF₂NO₄S: C, 51.49; H, 4.80; N, 3.34. Found C, 51.53; H, 4.93; N, 3.29. LC–MS (ESI) *m/z*: 384.0 [M+H⁺–(HCl)].

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-8-methoxy-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (55c). The title compound was prepared from **54c** in a manner similar to that described for the synthesis of **55a**. Yield 52%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.57–2.82 (m, 2H), 3.33–3.70 (m, 3H), 3.74–3.87 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 4.44 (br. s, 2H), 4.85 (br. s, 1H), 6.83 (tt, 1H, *J* = 8.6, 3.1 Hz), 7.21 (ddd, 1H, *J* = 10.3, 7.1, 3.0 Hz), 7.26–7.38 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.61–7.71 (m, 1H), 9.90 (br. s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.1, 43.2, 47.7, 53.2, 56.7, 64.8, 103.2, 107.3, 114.4, 116.6, 122.2, 127.6, 132.1, 133.5, 146.4, 148.1, 158.2, 157.4. Mp 211–212 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀ClF₂NO₄S: C, 51.49; H, 4.80; N, 3.34. Found C, 51.61; H, 4.99; N, 3.23. LC–MS (ESI) *m/z*: 384.1 [M+H⁺–(HCl)].

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-6-fluoro-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (56). The title compound was prepared from **52d** in a manner similar to that described for the synthesis of **38a** and **40a**. Yield 83%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.80 (br. s, 2H), 3.50 (br. s, 2H), 3.61–3.75 (m, 1H), 3.85–4.00 (m, 1H), 4.45 (br. s, 2H), 4.93 (br. s, 1H), 6.75–6.93 (m, 1H), 7.14–7.39 (m, 2H), 7.49–7.67 (m, 1H), 7.86–8.12 (m, 2H, *J* = 8.9, 5.5 Hz), 10.03 (br. s, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.0, 43.8, 45.9, 53.0, 65.4, 103.7, 107.8, 117.1, 118.4, 127.3, 136.7, 147.0, 150.2, 157.2, 160.3, 162.3, 165.7. Mp 233–235 °C. Anal. Calcd for C₁₇H₁₇ClF₃NO₃S: C, 50.06; H, 4.20; N, 3.43. Found C, 49.97; H, 4.06; N, 3.47. LC–MS (ESI) *m/z*: 372.1 [M+H⁺–(HCl)].

***N*-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-6-(methylsulfonyl)-3,4-dihydro-2*H*-thiochromen-4-amine**

1,1-dioxide hydrochloride (57). A mixture of **54a** (532 mg, 1.00 mmol), Pd₂dba₃ (91.6 mg, 0.100 mmol), NaSMe (105 mg, 1.50 mmol), and Xantphos (63.6 mg, 0.110 mmol) in xylene (5 mL) was stirred for 20 h at 140 °C, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:3–1:1) to provide a coupling product (419 mg, 84%) as an amorphous solid. To a solution of the product (400 mg, 0.800 mmol) in AcOEt (3 mL) was added *m*CPBA (394 mg, 1.60 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h at room temperature, poured into aqueous sodium thiosulfate,

and extracted with AcOEt. The extract was washed with aqueous NaHCO₃ and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified with column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:3–1:1) to provide a sulfonyl product (400 mg, 94%) as a colorless oil. The product and 4 M HCl in AcOEt (2 mL) were stirred for 1 h at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo. The resulting precipitate was filtered off and recrystallized from MeOH and diethylether to provide the title compound (172 mg, 49%) as a white solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.68–3.01 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.59–3.84 (m, 3H), 4.03 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.47 (br. s, 2H), 5.04 (br. s, 1H), 6.77–6.89 (m, 1H), 7.17–7.37 (m, 2H), 8.21 (s, 2H), 8.60 (br. s, 1H), 9.85 (br. s, 1H), 10.10 (br. s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 21.8, 43.2, 43.8, 44.7, 52.3, 65.0, 103.3, 107.2, 116.6, 124.8, 129.1, 130.4, 132.1, 143.7, 144.0, 146.4, 148.1, 158.3. Mp 222 °C. LC–MS (ESI) *m/z*: 432.0 [M+H⁺–(HCl)].

4-{{2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl}amino}-3,4-dihydro-2*H*-thiochromene-6-carboxamide 1,1-dioxide hydrochloride (58). A mixture of **54a** (1.50 g, 2.82 mmol), Pd(OAc)₂ (31.6 mg, 0.140 mmol), dppf (78.2 mg, 0.140 mmol), Et₃N (0.430 mL, 3.10 mmol) in MeOH (6 mL) and THF (6 mL) was stirred at 100 °C for 6 h under a carbon monoxide atmosphere, concentrated in vacuo, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 1:3–1:1) to provide a coupling product (1.43 g, 99%) as an

amorphous solid. A mixture of the product (1.27 g, 2.48 mmol) and 1 M NaOH (5 mL) in THF (10 mL) was stirred for 3 h at 50 °C. The mixture was acidified with 1 M HCl. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was washed with diethylether to provide a carboxylic acid product (1.00 g, 81%) as a colorless solid. A mixture of the product (300 mg, 0.600 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (0.126 mL, 0.724 mmol), HOBt·NH₃ (110 mg, 0.724 mmol), and WSC (139 mg, 0.720 mmol) in DMF (2 mL) was stirred for 19 h at room temperature, poured into water and extracted with AcOEt. The extract was washed with water and brine, dried with MgSO₄ and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 3:7–3:2) to provide an amide product (200 mg, 67%) as a colorless solid. A mixture of the product and 4 M HCl in AcOEt (2 mL) was stirred for 1 h at room temperature and concentrated in vacuo. The resulting precipitate was recrystallized from EtOH, diethyl ether, and water to provide the title compound (147 mg, 84%) as colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.69–2.97 (m, 2H), 3.53–3.77 (m, 3H), 3.95 (br. s, 1H), 4.45 (br. s, 2H), 4.95 (br. s, 1H), 6.78–6.88 (m, 1H), 7.16–7.35 (m, 2H), 7.76 (br. s, 1H), 7.96–8.07 (m, 1H), 8.12 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 8.24 (br. s, 1H), 8.45 (br. s, 1H), 9.71 (br. s, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.1, 43.9, 44.8, 52.9, 64.9, 103.3, 107.3, 116.6, 123.6, 129.5, 130.5, 137.9, 141.4, 146.3, 146.9, 149.3, 158.2, 166.4. Mp

224–226 °C; Anal. Calcd for C₁₈H₁₉ClF₂N₂O₄S·0.8H₂O: C, 48.34; H, 4.64; N, 6.26. Found C, 48.37; H, 4.70; N, 6.22. LC–MS (ESI) *m/z*: 397.1 [M+H⁺–(HCl)].

***N*⁴-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-*N*⁶-methyl-3,4-dihydro-2*H*-thiochromene-4,6-diamine 1,1-dioxide hydrochloride (59).** A mixture of **54a** (300 mg, 0.690 mmol), Pd₂dba₃ (10.3 mg, 11.3 μmol), XPhos (21.5 mg, 45.0 μmol), and 40% methyl amine in MeOH (161 mg, 2.08 mmol) in toluene (4 mL) was stirred for 17 h at 100 °C. The mixture was filtered through Celite and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel (AcOEt/hexane = 3:7–3:2) to provide a coupling product (114 mg). A mixture of the product and 4 M HCl in AcOEt (3 mL) was stirred for 1 h at room temperature and concentrated in vacuo. The resulting precipitate was filtered off and recrystallized from EtOH, diethyl ether and water to provide the title compound (80.8 mg, 28%) as an amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.62–2.86 (m, 5H), 3.40–3.59 (m, 3H), 3.68–3.82 (m, 1H), 4.46 (t, 2H, *J* = 5.1 Hz), 4.77 (br. s, 1H), 6.73–6.88 (m, 2H), 6.91 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz), 7.16–7.37 (m, 2H), 7.55 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 9.82 (br. s, 2H). (A NH proton was not observed). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 23.1, 29.8, 43.4, 46.0, 53.5, 65.3, 103.7, 107.8, 110.5, 114.6, 117.1, 125.1, 125.3, 132.5, 146.8, 148.7, 153.2, 158.7. LC–MS (ESI) *m/z*: 383.3 [M+H⁺–(HCl)].

(*R*)-*N*⁴-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-*N*⁶-methyl-3,4-dihydro-2*H*-thiochromene-4,6-diamine 1,1-dioxide hydrochloride ((*R*)-59). Optical resolution of the coupling product (400 mg,

0.830 mmol) described in the synthesis of **59** was performed using HPLC (Chiralpak ASH (LA005), 20 mm i.d. × 250 mm length, solvent phase CO₂/MeOH = 700/300) after desalting. The desired fraction with smaller retention time was separated and concentrated in vacuo. To the residue (192 mg, >99.9% ee) was added 4 M HCl in AcOEt (2 mL) at room temperature. The resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from *i*-PrOH, diethyl ether, and water to give the title compound (83.2 mg, 50%) as a colorless solid. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.57–2.84 (m, 5H), 3.40–3.57 (m, 3H), 3.72 (br. s, 1H), 4.42 (br. s, 2H), 4.76 (br. s, 1H), 6.63–6.89 (m, 4H), 7.15–7.37 (m, 2H), 7.56 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 9.35–9.79 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 22.7, 29.3, 43.0, 45.5, 53.0, 64.9, 103.3, 107.3, 109.9, 114.0, 116.6, 124.6, 124.7, 132.0, 146.4, 148.1, 152.7, 158.3. Mp 173–175 °C. Anal. Calcd for C₁₈H₂₁ClF₂N₂O₃S: C, 51.61; H, 5.05; N, 6.69. Found C, 51.67; H, 5.00; N, 6.63. LC–MS (ESI) *m/z*: 383.3 [M+H⁺–(HCl)]. [α]_D²⁵ –58.4 (*c* 0.229, MeOH).

(*S*)-*N*⁴-[2-(2,5-Difluorophenoxy)ethyl]-*N*⁶-methyl-3,4-dihydro-2*H*-thiochromene-4,6-diamine 1,1-dioxide hydrochloride ((*S*)-59**).** Optical resolution of the coupling product (400 mg, 0.830 mmol) described in the synthesis of **59** was performed using HPLC (Chiralpak ASH (LA005), 20.0 mm i.d. × 250 mm length, solvent phase CO₂/MeOH = 700/300) after desalting. The desired fraction with larger retention time was separated and concentrated in vacuo. To the residue (192 mg, >99.9% ee) was added 4 M HCl in AcOEt (2 mL) at room temperature. The

resulting precipitate was collected by filtration and recrystallized from *i*-PrOH, diethylether, and water to give the title compound (102 mg, 61%) as a colorless solid. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 2.67–2.82 (m, 5H) 3.40–3.56 (m, 3H) 3.74 (t, 1H, J = 11.6 Hz), 4.45 (br. s, 2H), 4.77 (br. s, 1H), 6.71 (br. s, 1H), 6.78 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.80–6.86 (m, 1H), 6.88 (br. s, 1H), 7.22 (ddd, 1H, J = 10.0, 7.1, 2.8 Hz), 7.30 (ddd, 1H, J = 10.8, 9.2, 5.3 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 9.55–9.92 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 22.6, 29.2, 43.1, 45.3, 53.0, 64.8, 103.2, 107.2, 109.8, 113.9, 116.5, 124.6, 124.7, 131.9, 146.3, 148.1, 152.6, 158.2. Mp 173–175 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 51.61; H, 5.05; N, 6.69. Found C, 51.73; H, 5.07; N, 6.66. LC–MS (ESI) m/z : 383.3 $[\text{M}+\text{H}^+-(\text{HCl})]$. $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +57.4$ (c 0.226, MeOH).

X-ray structure analysis

Crystal data for tartaric acid form of (S)-59: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+ \cdot \text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_8^- \cdot \text{H}_2\text{O}$, MW = 758.74; crystal size, 0.27 x 0.18 x 0.04 mm; colourless, plate; orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, a = 7.41134(4) Å, b = 19.07330(9) Å, c = 24.37340(11) Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, V = 3445.39(3) Å³, Z = 4, D_x = 1.463 g/cm³, T = 100 K, μ = 1.537 mm⁻¹, λ = 1.54187 Å, R_1 = 0.021, wR_2 = 0.057, Flack Parameter⁴²⁾ = 0.004(3).

All measurements were made on a Rigaku XtaLAB P200 diffractometer using graphite monochromated Cu-K α radiation. The structure was solved by direct methods with SIR2008⁴³⁾ and was refined using full-matrix least-squares on F^2 with SHELXL-2014/7.³⁷⁾ All non-H atoms

were refined with anisotropic displacement parameters.

CCDC 1534271 for compound (*S*)-**59** contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/Community/Requestastructure/Pages/DataRequest.aspx?>.

Drawing Structure

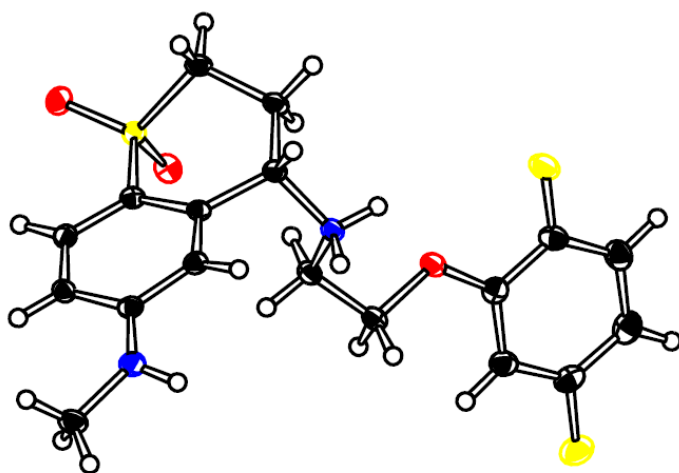


Figure 23. ORTEP diagram of (*S*)-**59**, thermal ellipsoids are drawn at 50% probability.

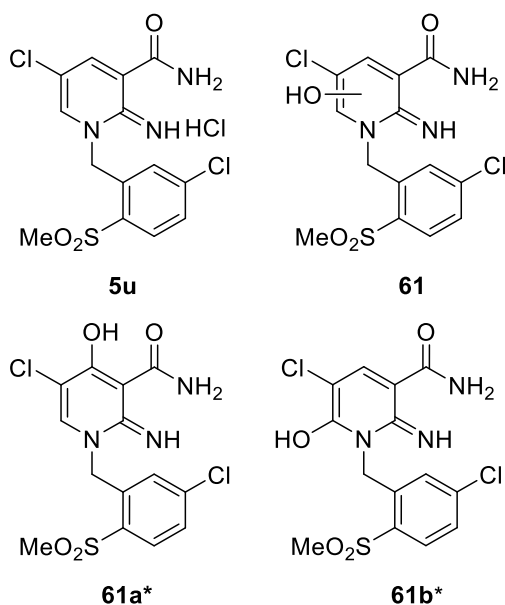
References

- (40) (a) Sagratini, G.; Angeli, P.; Buccioni, M.; Gulini, U.; Marucci, G.; Melchiorre, C.; Poggesi, E.; Giardinà, D. Synthesis and α_1 -adrenoceptor antagonist activity of tamsulosin analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5800-5807. (b) Pallavicini, M.; Budriesi, R.; Fumagalli, L.; Ioan, P.; Chiarini, A.; Bolchi, C.; Ugenti, M. P.; Colleoni, S.; Gobbi, M.; Valoti, E. WB4101-related compounds: New, subtype-selective α_1 -adrenoreceptor antagonists (or inverse agonists?). *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7140-7149.
- (41) Zhao, F.; Li, J.; Chen, Y.; Tian, Y.; Wu, C.; Xie, Y.; Zhou, Y.; Wang, J.; Xie, X.; Liu, H. Design, synthesis, and biological evaluation of indoline and indole derivatives as potent and selective α_{1A} -adrenoceptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3826-3839.
- (42) Flack, H.D. On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Cryst.* **1983**, *A39*, 876-881.
- (43) Burla, M.C. Caliendo, Camalli, R. M. Carrozzini, B. Cascarano, G. L. De Caro, Giacovazzo, L. Polidori, C. G. Siliqi, D. Spagna, R. *IL MILION*: a suite of computer programs for crystal structure solution of proteins. *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 609-613.

第四章 TAK-259 代謝物の単離、構造決定および合成法の検討

第一節 TAK-259 代謝物の単離と構造決定

第二章と第三章でそれぞれ見出した化合物 **5u** と (*S*)-**59** を比較して、**5u** はやや活性が低いものの CYP3A4 など優れた ADME プロファイルを有し、さらに *in vivo* 試験においても良好な結果を示したことから、開発コード TAK-259 として臨床試験へと進めるため各種精査試験を実施した。その過程において実施した代謝物解析試験において、ラットやマウスからは代謝物が確認されなかった。一方で、サルの尿および血漿中から代謝物が確認された。この代謝物について構造を明らかにするべく LC-MS/MS および NMR を用いて解析した結果、代謝部位はイミノピリジン環上で水酸化された化合物 **61** と推定した (Figure 24)。また、化合物 **61** について動物種差を調べた結果、ヒトとサル特異的に生成することも明らかとなった。



* hydroxy group possibly keto form

Figure 24. Structures of **5u** (TAK-259) and its metabolite (**61**). **61a** and **61b**, possible structures of **61**.

第一章第九節で述べたように、代謝部位として予想した水酸化体全てを合成することは困難と考え、主排泄経路である尿から代謝物の単離と構造決定を実施した。4匹のサル1日分の尿サンプルから代謝物を抽出し、抽出物を TOF/MS を用いて解析を行った (Figure 25)。代謝物 **61** は、 m/z 値 390 で保持時間 6.01 分に確認された (Figure 24 (A) および(B))。一方、原体の化合物 **5u** は、Figure 24 (C)のグラフに示したように m/z 値 374、保持時間 3.63 で観測された。抽出液を HPLC で精製し、結晶化することにより目的の代謝物 **61** を得た。

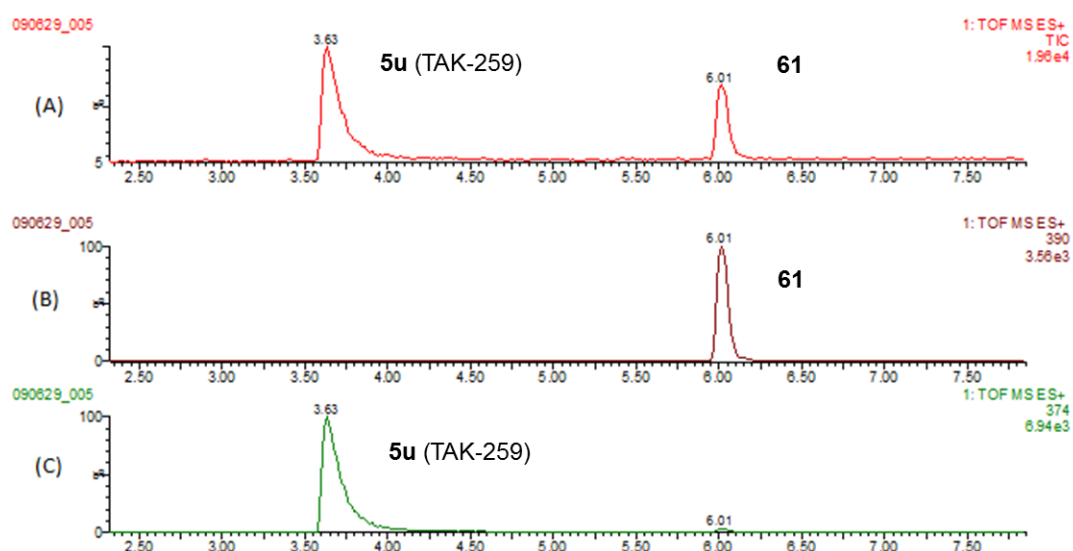
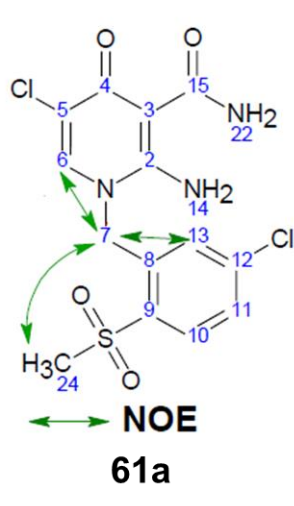


Figure 25. Ion chromatograms of ethyl acetate (AcOEt) extracts from monkey urine. (A) Total ion, (B) extracted ion of m/z 390, and (C) extracted ion of m/z 374.

得られた代謝物は、NMR 解析によりケト型の 2-アミノ-4-ピリドンであると決定した (Table 13)。 ^1H -NMR スペクトルではピリジン環に水素原子が一つのみ観測されたことから、ピリジン環が酸化代謝を受けたことを示唆していた。 ^{13}C -NMR スペクトルでは、170 ppm 付近に 2 つのピークがありカルボニル基が 2 つ存在することが示唆されたこと

から、代謝物の構造は DMSO 溶媒中では Figure 23 に示したエノール型の化合物 **61a** ではなく、ケト型であることが推定された。カルボニル基の位置を特定するため NOE を測定した。その結果、ベンジル位と考えられる H-7 とピリジン環上と考えられる H-6、1 位末端フェニル基上の H-13 およびメチルスルホニル基末端の H-24 との間に強い NOE が観測された。このことから、ピリドン上のカルボニル基は 4 位に位置していることが示唆された。以上の結果から、代謝物の構造は、**61a** のケト型であると決定した。

Table 13. Metabolite NMR spectra and Nuclear Overhauser effect (NOE) of metabolite **61a**.

 <p>61a</p>		1H	δ (ppm)	13C	δ (ppm)
		24	3.39 (3H, s)	24	44.22
		7	5.54 (2H, s)	7	51.06
		13	6.76 (1H, d, J = 2.2 Hz)	3	96.08
		22	7.42 (1H, d, J = 5.0 Hz)	5	118.31
		11	7.74 (1H, dd, J = 8.4, 2.2 Hz)	13	125.52
		10	8.04 (1H, d, J = 8.4 Hz)	11	128.63
		6	8.06 (1H, s)	10	132.45
		22	10.30 (1H, d, J = 5.0 Hz).	6	136.43
				8	136.61
				9	136.86
				12	139.09
				2	156.18
				15	170.26
				4	171.38

第二節 合成法の確立

構造決定した代謝物 **61a** は、開発を進めるにあたり毒性試験を実施する必要があるためグラムスケール量を供給する必要があった。そこでまず、その合成ルートを確認すべく、逆合成解析を実施した (Figure 26)。化合物 **61a** は、2-アミノピリジン E にベンジルハライド D を用いてアルキル化し C を得た後、4 位のメトキシ基を脱メチル化することにより合成できると考えた。化合物 E は、市販の 2-アミノ-4-メトキシピリジン-3-カルボニトリル F から二段階で導くことを計画した。

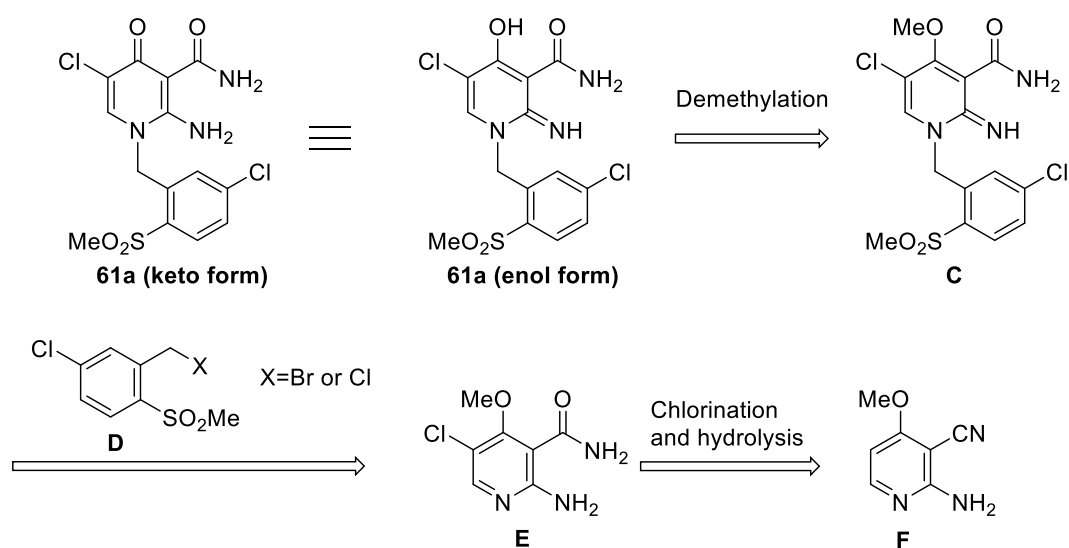
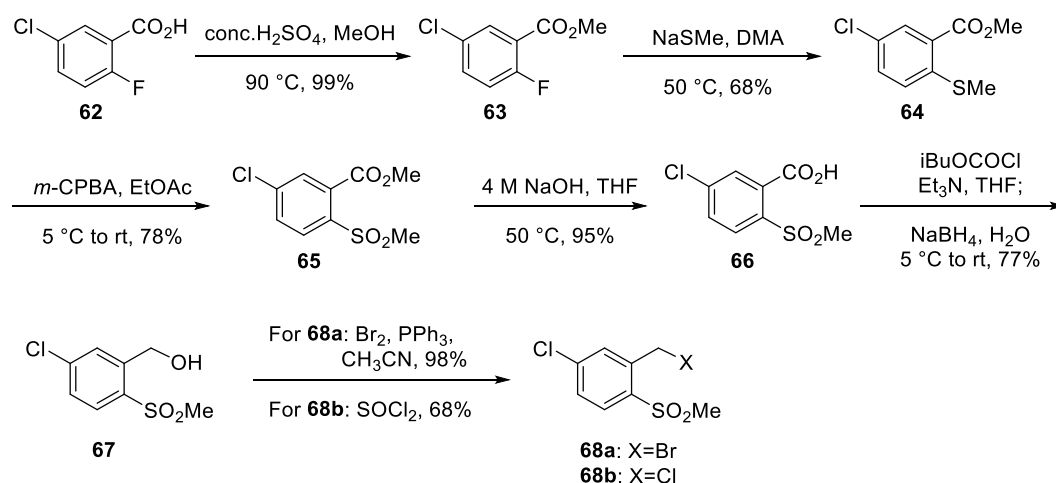


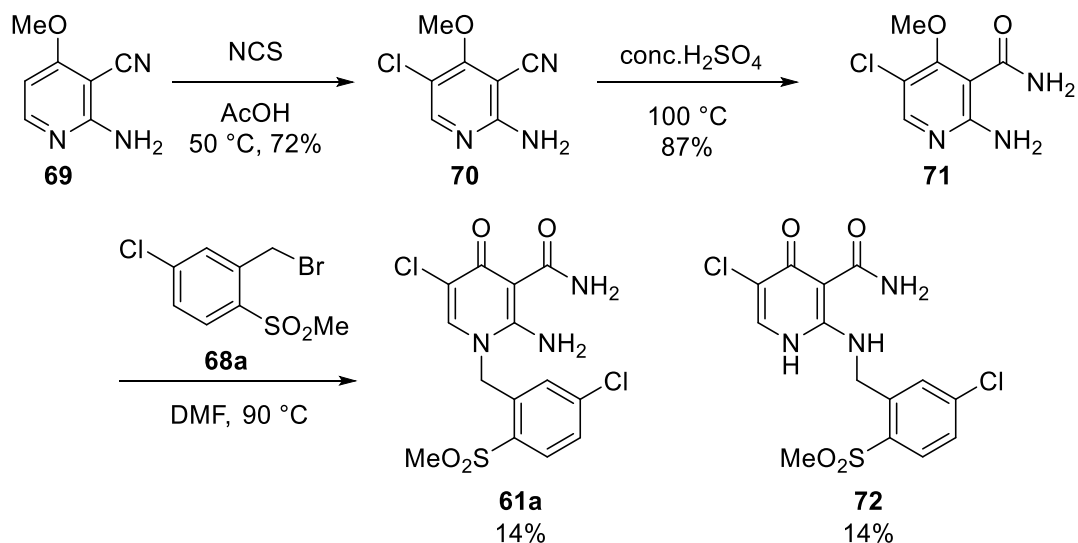
Figure 26. Retrosynthesis of **61a**

ベンジルハライド **D** (**68a** と **68b**) は、Scheme 7 に示したルートを用いて合成した。市販の 5-クロロ-2-フルオロ安息香酸 (**62**) に対してメタノール溶媒中触媒量の濃硫酸存在下、エステル化反応を行ってメチルエステル **63** を得た。次に、DMA 溶媒中化合物 **63** とナトリウムチオメトキシドを 50℃で反応させてメチルスルファニル基を導入して、化合物 **64** へ導いた。スルファニル基を *m*CPBA を用いて酸化してスルホニル基へと変換し、4 モル濃度の水酸化ナトリウムによりエステルを加水分解して安息香酸 **66** とした後、カルボキシル基を還元してベンジルアルコール **67** を得た。化合物 **67** を得る合成法は、化合物 **65** のメチルエステルを還元すれば合成できると考えられるが、3 位クロロ基が同時に還元されると推定し、本ルートを選択した。最後に、臭素とトリフェニルホスフィンまたは塩化チオニルを用いてベンジルハライド **68a** と **68b** をそれぞれ合成した。



Scheme 7. Synthesis of benzyl halides **68a** and **68b**

逆合成解析に従って、多置換ピリジン **C** から代謝物 **61a** を合成したルートを Scheme 8 に示した。市販の 2-アミノピリジン **69** を NCS によりクロロ化して四置換ピリジン **70** を得た後、シアノ基を濃硫酸を用いて加水分解して目的のピリジンカルボキサミド **71** を収率よく合成した。得られた化合物 **71** を Scheme 7 に示した臭化ベンジル **68a** と DMF 溶媒中 90°C で加熱することにより、望みのピリジン環の窒素原子上でアルキル化した化合物 **61a** を 14% の収率で得ることに成功した。興味深いことに、この反応条件下でピリジン環上 4 位の脱メチル化が同時に進行した。反応機構として、ピリジン環の窒素原子が臭化ベンジルに求核攻撃したことにより生成した臭化物イオンが脱メチル化を進行させたと考えている。さらに、分離可能な副生成物として位置異性体の化合物 **72** も同等の収率で得られた。本反応で得られた化合物 **61a** の NMR と MS スペクトルデータは、サルの尿から単離・構造決定されたデータと一致し、サル特異的な代謝物は **61a** であることを明らかにした。以上の結果から、代謝物 **61a** の合成経路を確立することに成功した。

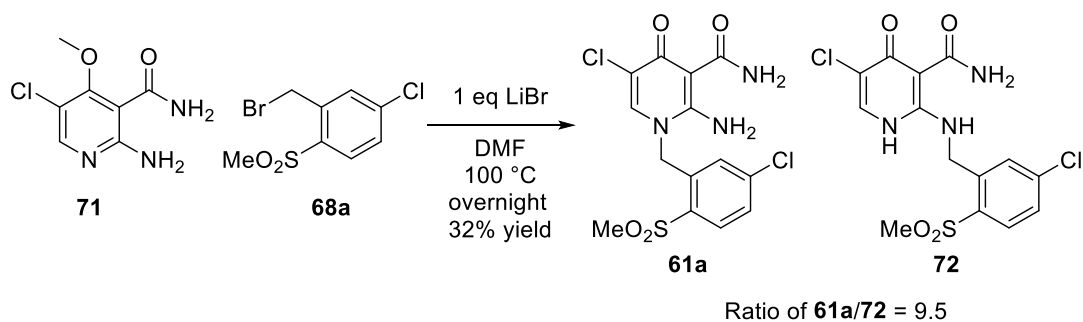


Scheme 8. Initial synthetic route of **61a**

第三節 反応条件の最適化

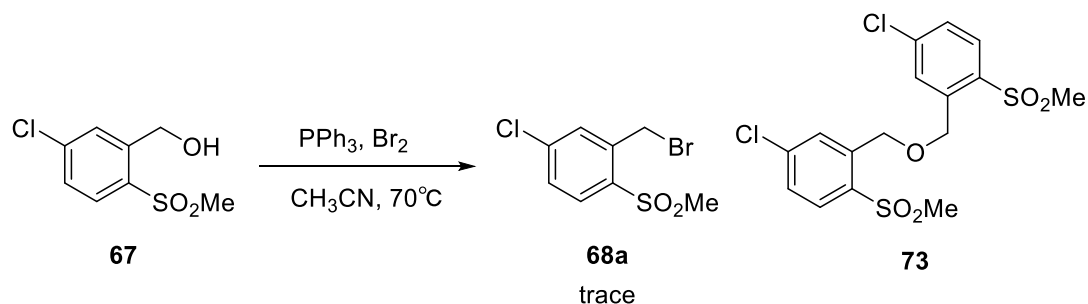
代謝物の同定と合成経路の確立は達成したものの合成収率が低いことから、毒性試験を実施するために必要な代謝物を効率的に供給するため、より収率よく化合物 **61a** を合成することを目的に反応条件の検討を行った。Scheme 8 で記述したとおり、化合物 **71** から **61a** を導く反応において位置異性体の副生成物が同量生成することから、化学収率を向上させるためには、副反応を抑制することが鍵であると考えられた。2-アミノピリジンのアルキル化反応で *N*-ベンジル化は、主にピリジン環 1 位で 40~80%の収率で進行することが報告されている⁴⁴⁾。しかし、化合物 **71** と同様にピリジン環 4 位にメトキシ基を有する化合物に対して *N*-アルキル化を検討した報告例はほとんどなく、最適化を実施する必要があった。第三章第二節で示した 2-アミノ-4-メトキシピリジンと臭化ベンジルとの反応でピリジン環上 4 位の脱メチル化が進行したことから、反応により生じた臭化物イオンが脱メチル化に重要な役割を果たしていると考えた。そこで、筆

者は添加剤を加えることにより速やかに脱メチル化が進行し、ピリジン環上 1 位の反応性が向上し、位置選択性向上により収率が改善できると期待した。この仮説を検証するため、2-アミノピリジン **71** に対して 1 モル当量の臭化リチウム存在下、臭化ベンジル **68a** と反応させた (Scheme 9)。その結果、望み通り位置選択性と収率の改善が見られた。



Scheme 9. Effects of LiBr on alkylation of **71**.

Scheme 9 において見出された条件を用いて毒性試験に必要な 1g を確保するため、Scheme 7 に示したルートに従い臭化ベンジル **68a** のスケールアップ合成を行った。しかし、ベンジルアルコール **67** から臭化ベンジル **68a** を得る反応段階において、目的の臭化ベンジル **68a** と分離困難な副生成物として化合物 **73** が LCMS 解析から確認された (Scheme 10)。副反応を抑えることを目的として、反応試薬を四臭化炭素とした場合においても同様の副生成物が認められたため、臭化ベンジル **68a** を用いた合成ルートを変更することとした。

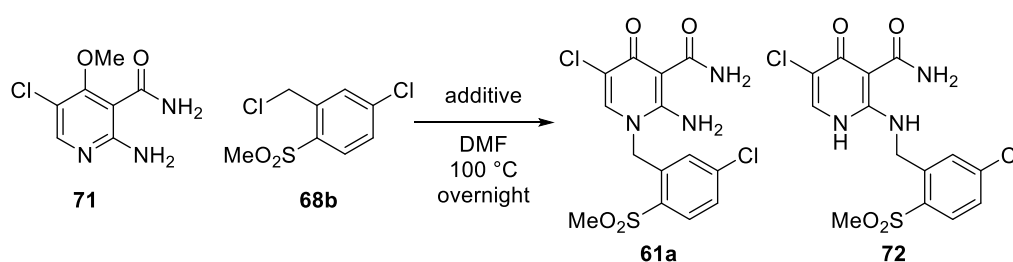


Scheme 10. Bromination of benzylalcohol **67**.

Scheme 10 の結果から、臭化ベンジル **68a** をベンジルアルコールと反応させることを抑える目的でより脱離能の低い塩化ベンジル **68b** を用いることとした。Scheme 7 に示した塩化チオニルを用いて反応を行うことにより、副反応が進行することなく目的の塩化ベンジル **68b** を 6.8 g 得ることに成功した。次に、化合物 **71** と塩化ベンジル **68b** とのアルキル化反応について、位置選択性と反応収率に対する影響を調べることを目的とし、反応条件の検討を実施した。また、より迅速に最適な条件を見出すため HPLC を用いて内部標準との比率を算出することにより反応収率を測定することとし、最適な条件に対して単離収率を算出する手法を選択した。添加剤存在下で反応を検討した結果を Table 14 に示した。全ての反応は、1 mL の DMF 溶媒中 0.1 mmol の化合物 **71** と塩化ベンジル **68b** を 100°C で加熱する条件とした。まず、添加剤を加えず塩化ベンジル **68b** を化合物 **71** と反応させると、目的物 **61a** および位置異性体 **72** はほとんど得られず出発原料の化合物 **71** が残存していた (entry 1)。Scheme 8 の検討において、目的の化合物 **61a** が得られたことから、アルキル化反応を進行させるには塩化ベンジル **68b** を臭化ベンジル **68a** に変換する必要がある。そこで、添加剤として Scheme 9 において検討した臭化リチウムを用いて、そのモル当量について検討を行った (entries 2, 3)。その結果、臭化リチウム存在下で反応は進行し、2 モル当量の臭化リチウムを用いた反応条件がもっとも良

好な収率と位置選択性を示した。また、臭化リチウム以外の添加剤としてヨウ化リチウムまたは臭化ナトリウムを用いた場合には、収率と選択性の改善が見られなかった (entries 4, 5)。ヨウ化リチウムを用いた場合は、反応性の高いヨウ化ベンジルが生成するため位置選択性が低下することにより収率の低下が見られたと考えられる。臭化ナトリウムを用いた場合は、臭化リチウムと比べて溶媒に対する溶解度が異なるため目的の脱メチル化が遅くなり位置選択性の低下が起こり、収率の低下が起こったと推察される⁴⁵⁾。そのため、臭化リチウムが最適な添加剤であると考えた。

Table 14. Effects of additives on alkylation of **71**



Entry ^a	Additive (equiv)	Yield of 61a (%) ^b	Ratio of 61a / 72 ^c
1	None	Trace	—
2	LiBr (1.0)	36	4.7
3	LiBr (2.0)	38	5.2
4	LiI (2.0)	29	2.8
5	NaBr (2.0)	33	3.4

^a >99.9% conversion except for entry 1. See text for entry 1.

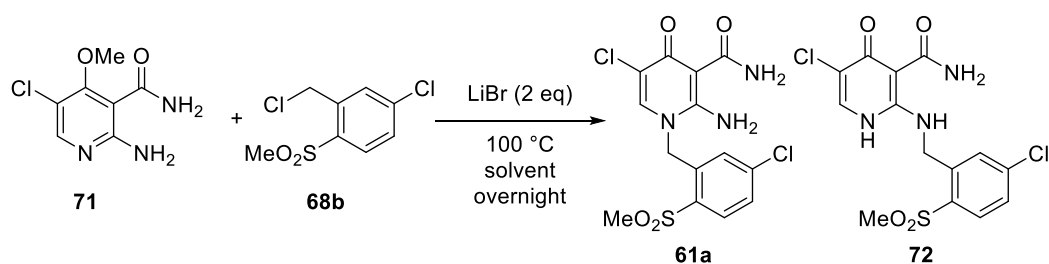
^b Yields were determined by HPLC analysis with an internal standard.

^c Ratios were calculated by % area of **61a** and **72** on HPLC. (λ = 220 nm)

続いて、Table 14 でもっとも良好な結果を与えた 2 当量の臭化リチウム存在下、ベンジル化反応における溶媒および塩基の効果を調べた (Table 15)。まず、溶媒効果に関しては、DMA を用いた場合に最も優れた結果を与えた。その他の極性溶媒を用いた場合は、DMA に比べて収率と選択性共に低下した (entries 2-5)。溶媒効果検討の結果では、特に、ブチロニトリルやイソプロパノールを溶媒とした場合、化合物 **71** の溶媒に対す

る溶解性が低いまたは臭化リチウムの溶解性が低いため、塩化ベンジルとのハロゲン交換反応が遅かったことが収率および選択性低下の原因と考えている。次に、塩基としてトリエチルアミンを添加した場合の影響を調べた結果、収率が改善されることが明らかになった。(entry 6)。トリエチルアミンの添加により、臭化リチウムから生成する臭化物イオンの溶媒への溶解度が増大し、反応系中における臭化物イオン濃度が増加したため収率が向上したと考えている。以上の結果から、反応溶媒として DMA、さらにトリエチルアミンを塩基として加える条件が反応系中の臭化物イオンを増大させ、収率を改善できると考えた。

Table 15. Effects of reaction temperature and solvents



Entry ^a	Solvent	Base	Yield of 61a (%) ^b	Ratio of 61a / 72 ^c
1	DMF	free	38	5.2
2	DMA	free	57	5.5
3	NMP	free	35	4.1
4	BuCN	free	22	1.5
5	iPrOH	free	20	1.6
6	DMF	Et ₃ N	48	4.8

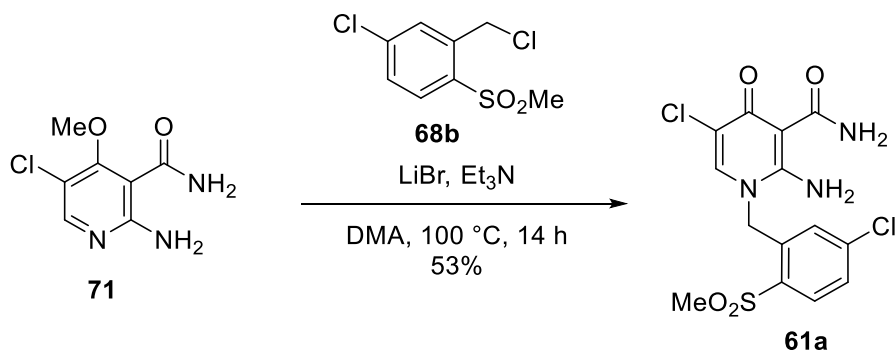
^a >99.9% conversion except for entry 4 and 5. When BuCN and iPrOH were used as solvents, the starting material **71** was remained by 0.55 to 6.52% of area in the reaction mixture.

^b Yields were determined by HPLC analysis with an internal standard.

^c Ratios were calculated by % area of **61a** and **72** on HPLC analysis ($\lambda = 220$ nm).

Table 14 と 15 の検討の結果、筆者は 2-アミノピリジンとのアルキル化反応の最も好ましい条件として、DMA 溶媒中 2 当量の臭化リチウムとトリエチルアミン存在下、100℃で加熱する条件を見出した。この条件を用いて反応を実施した結果、代謝物 **61a**

が初期合成ルート（14%）に比べて約 3 倍の 53%の単離収率で得られ、毒性試験用サンプル 1g を合成した（Scheme 11）。

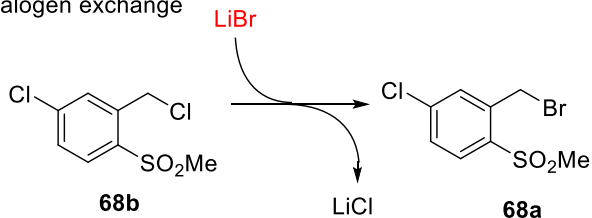


Scheme 11. Preparative synthesis of **61a** under optimized conditions

化合物 **61a** の合成において、臭化リチウムの添加は収率の向上だけでなく位置選択性も改善する効果を示した。位置選択性が改善した理由を説明するために推定反応機構を Figure 27 に示す。始めにハロゲン交換が塩化ベンジル **68b** と臭化リチウム間で起こり臭化ベンジル **68a** となる（Step 1）。臭化リチウムを添加しない条件では、出発物質として臭化ベンジル **68a** を用いた場合において反応が進行し、化合物 **71** と **68a** との求核置換反応は、ピリジン環上 1 位および 2 位のアミノ基と反応し、その際に生成した臭化物イオンがピリジン環 4 位の脱メチル化を行うことにより、化合物 **72** と **61a** が得られる。これに対して、臭化リチウム存在下では 4 位の脱メチル化が起こると同時に化合物 **71** と **68a** の間でアルキル化反応が進行するため、4-ピリドン **61a** が優先的に生成する。その結果、副生成物の位置異性体 **72** の生成が抑えられたと考えている。また、塩基としてトリエチルアミンを添加した場合、溶媒に対する溶解度の高いアンモニウム塩が生成することにより、塩化ベンジル **68b** から臭化ベンジル **68a** へのハロゲン交換反応および化合物 **71** のピリジン環 4 位の脱メチル化が速やかに進行することにより反応収

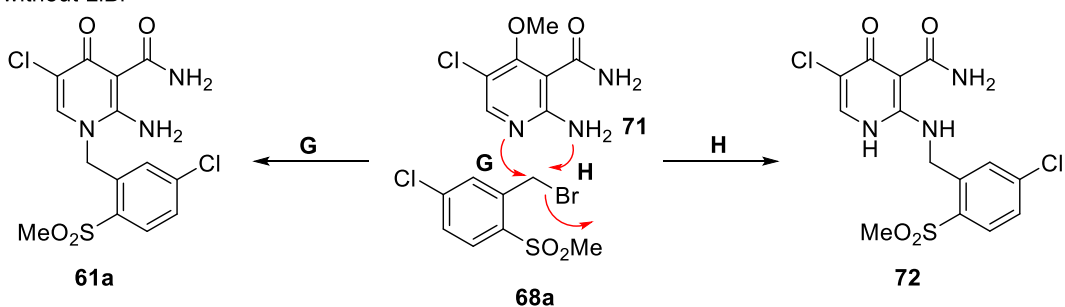
率が向上したと考えた。

Step 1: Halogen exchange



Step 2: Alkylation step

i) without LiBr



ii) with LiBr

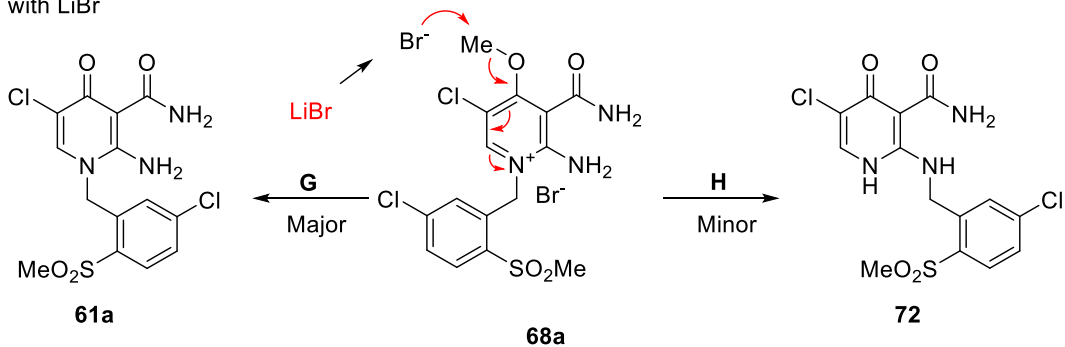


Figure 27. Plausible mechanism for alkylation step in synthesis of **61a**.

第四節 生物評価

第四章第三節で述べた合成ルートを用いて合成した代謝物 **61a** の α_1 受容体各サブタイプの結合親和性を評価した。Figure 28 に示したように、**5u** と比べて特に α_{1D} の活性が大幅に減弱した。この結果は、第二章第四節で述べたイミノピリジン誘導体の SAR で、

2位のイミノ基が活性発現に必須であったこと (Table 1、化合物 **6**) と一致する。また、代謝物 **61a** は、他のサブタイプ 1A および 1B に対する親和性も低いことから、他のサブタイプに基づく副作用が低いものと推察された。実際、代謝物 **61a** を用いた安全性試験においても重篤な副作用は確認されなかった。以上の結果から、本代謝物はヒトにおける薬効に対する寄与は低く、またサブタイプの活性に伴う副作用の懸念が少ないことを明らかにした。

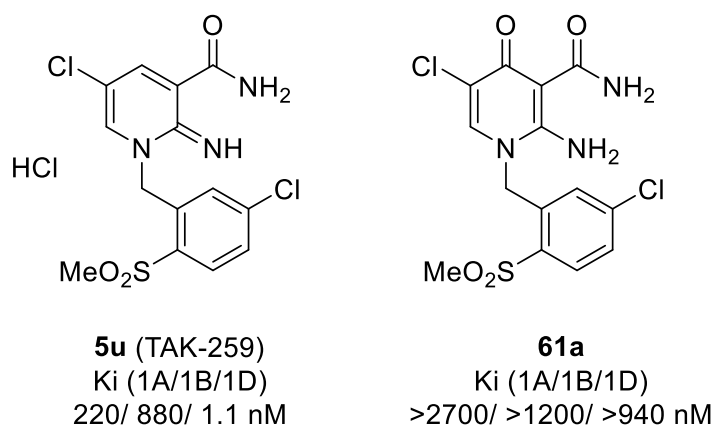


Figure 28. Binding affinities of **5u** and **61a**.

第五節 まとめ

選択的アドレナリン α_{1D} 拮抗薬の臨床候補化合物として選出した **5u** (TAK-259) を臨床段階へと進めるため、その代謝物について検討を実施した。その結果、サル特異的な代謝物が生成することを確認し、サルの尿から抽出・精製を行うことにより代謝物 **61a** を単離することに成功した。単離した代謝物に関して NMR を用いた構造解析を実施し、2-アミノ-5-クロロ-1-[5-クロロ-2-(メチルスルホニル)ベンジル]-4-オキソ-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボキサミドと同定した。**61a** の効率的な合成の最終工程は、臭化リチウムとトリエチルアミン存在下、DMA を溶媒として用いることが最適条件であることを見

出した。本条件を検討した報告はこれまでほとんど例がなく、2-アミノピリジンの位置選択的アルキル化反応について有用な知見であると考えられる。さらに代謝物 **61a** は、 α_1 受容体のいずれのサブタイプに対しても親和性が低いことを明らかにした。

Experimental Section

Isolation of **5u** (TAK-259) metabolite

The metabolite was obtained from the urine samples of four monkeys, following oral administration of **5u** (100 mg/kg). The urine was filtered to remove insoluble materials, and the filtrate was frozen for preservation. Prior to isolation, the urine was allowed to warm to rt, extracted with AcOEt, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The residue (200 mg) was purified using an AutoPurification HPLC-MS system (Waters), and the TFA was removed using MP-HCO₃ MP SPE resin (Polymer Laboratories). Crystallization of the product from AcOEt and hexane produced the metabolite (41.0 mg) as colorless crystals.

LC-MS conditions: Instrument, SYNAPT-MS; capillary, 1.7 kV; sampling cone, 40 V; column, BEH C18, 1.7- μ M, 100 \times 2.10 mm i.d.; mobile phase A, CH₃CN/10 mM NH₄OAc = 5/95; B, CH₃CN/10 mM NH₄OAc = 9/1; gradient, A/B = 98/2 to 55/45, linear gradient over 10 min; flow rate, 0.500 mL/min; detection, 234 nm; column temperature, 40 °C; injection volume, 10.0 μ L; ionization, ESI; and polarity, positive.

HPLC conditions: Instrument, Waters AutoPurification HPLC-MS System; column, Waters XBridge (30 \times 75 mm, 5- μ m); load, 6 mg/load; solvent A, water containing 0.1% TFA; B, CH₃CN containing 0.1% TFA; gradient, A/B = 95/5 (0.00–0.50 min), 95/5 to 5/95 (0.50–4.75 min), 5/95 to 1/99 (4.75–5.25 min), 1/99 (5.25–7.25 min), 1/99 to 95/5 (7.25–7.50 min), 95/5

(7:50–8.00 min); flow rate, 20.0 mL/min; detection, UV 220 nm; and ESI-MS, positive mode, 389 ± 1 .

NMR conditions: Instrument, Bruker AV-600; temperature, 27 °C (300 K); solvent, DMSO- d_6 ; and density, 4.30 mg/0.600 mL.

Methyl 5-chloro-2-fluorobenzoate (63). A mixture of 5-chloro-2-fluorobenzoic acid **62** (4.80 g, 27.5 mmol) and conc. H_2SO_4 (0.500 mL) in MeOH (100 mL) was heated at 90 °C for 14 h. To the mixture was added 0.500 mL of conc. H_2SO_4 , and the mixture was stirred at 90 °C for 14 h. After cooling, aqueous NaHCO_3 was added, and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in water and AcOEt. The separated organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated to yield the title compound (5.15 g, 99%) as a colorless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.93 (3H, s), 7.09 (1H, dd, $J = 10.2, 9.0$ Hz), 7.46 (1H, ddd, $J = 6.6, 3.7, 3.0$ Hz), 7.90 (1H, dd, $J = 6.3, 2.7$ Hz).

Methyl 5-chloro-2-(methylsulfanyl)benzoate (64). A mixture of **63** (4.72 g, 25.0 mmol) and sodium thiomethoxide (2.10 g, 30.0 mmol) in DMA (15 mL) was stirred at 50 °C for 3 h. The mixture was concentrated, and the residue was poured into AcOEt and water. The separated organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated. The residue was

purified using silica gel column chromatography (eluted with 10% AcOEt in hexane) to yield the title compound (3.70 g, 68%) as a white powder. ^1H NMR (300 Hz, CDCl_3) δ : 2.45 (3H, s), 3.92 (3H, s), 7.18 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.42 (1H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz), 7.97 (1H, d, $J = 2.7$ Hz). Mp 59–61 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_2\text{S}$: C, 49.89; H, 4.19. Found: C, 49.90; H: 4.01.

Methyl 5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzoate (65). To a cold solution of **64** (0.970 g, 4.48 mmol) in AcOEt (10 mL) was added *m*CPBA (2.43 g, 9.85 mmol) at 5 °C, and then the mixture was stirred at rt for 14 h, and poured into aqueous NaHCO_3 and AcOEt. The separated organic layer was washed with water, dried over MgSO_4 , and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 25% AcOEt in hexane) to yield the title compound (0.870 g, 78%) as a colorless powder. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.34 (3H, s), 3.98 (3H, s), 7.62 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz), 7.68 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz). Mp 55–57 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_4\text{S}$: C, 43.47; H, 3.65. Found: C, 43.71; H: 3.55.

5-Chloro-2-(methylsulfonyl)benzoic acid (66). A mixture of **65** (0.860 g, 3.46 mmol) in 4 M NaOH (8 mL) and THF (8 mL) was heated at 50 °C for 2 h, cooled to rt, and acidified with 8 M HCl. The product was extracted with AcOEt, washed with water and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated to yield the title compound (0.770 g, 95%) as a colorless powder. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.41 (3H, s), 6.70–7.15 (1H, br), 7.68 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz),

7.84 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 8.11 (1H, d, $J = 8.4$ Hz). Mp 152–154 °C. Anal. Calcd for $C_8H_7ClO_4S \cdot 0.1AcOEt$: C, 41.44; H, 3.23. Found: C, 41.44; H: 3.00.

[5-Chloro-2-(methylsulfonyl)phenyl]methanol (67). To a cold solution of **66** (0.230 g, 1.00 mmol) and Et_3N (170 μ L, 1.20 mmol) in THF (5 mL) was added 2-methylpropyl chlorocarbonate (160 μ L, 1.20 mmol) at 5 °C, and then the mixture was stirred at 5 °C for 30 min. A solution of sodium borohydride (190 mg, 5.00 mmol) in water (1 mL) was added, and the mixture was stirred at rt for 2 h and poured into water and AcOEt. The separated organic layer was washed with aqueous NH_4Cl and brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 50% AcOEt in hexane) followed by crystallization from AcOEt and hexane yield the title compound (0.170 g, 77%) as a colorless solid. 1H NMR (300 Hz, $CDCl_3$) δ : 2.91 (1H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.17 (3H, s), 4.94 (2H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.49 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 7.97 (1H, d, $J = 8.4$ Hz). Mp 85–87 °C. Anal. Calcd for $C_8H_9ClO_3S$: C, 43.54; H, 4.11. Found: C, 43.54; H: 3.89.

2-(Bromomethyl)-4-chloro-1-(methylsulfonyl)benzene (68a). To a solution of PPh_3 (2.29 g, 8.73 mmol) in CH_3CN (50 mL) was added Br_2 (450 μ L 9.19 mmol) at rt and the mixture was stirred for 30 min. Then, **67** (800 mg, 3.63 mmol) was added, the mixture was stirred at 70 °C for 1.5 h, and then poured into water. The product was extracted with AcOEt, and the extract was washed with aqueous NH_4Cl and brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated in vacuo. The

residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 5%–15% AcOEt in hexane) to yield the title compound (1.01 g, 98%) as a white powder. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.25 (3H, s), 5.01 (2H, s), 7.48 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.57 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 8.00 (1H, d, $J = 8.4$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 27.8, 45.1, 129.6, 131.9, 133.3, 136.9, 139.2, 140.7. Mp 132–133 °C.

4-Chloro-2-(chloromethyl)-1-(methylsulfonyl)benzene (68b). A mixture of **67** (9.37 g, 42.5 mmol) and thionyl chloride (30.0 mL, 411 mmol) was stirred at 90 °C for 16 h and concentrated in vacuo. The residue was diluted with AcOEt and water. The organic layer was separated and washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 5%–50% AcOEt in hexane) to yield the title compound (6.91 g, 68%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.22 (3H, s), 5.10 (2H, s), 7.52 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz), 7.62 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.03 (1H, d, $J = 8.7$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 41.5, 45.3, 129.6, 131.8, 132.8, 137.1, 138.7, 140.8. Mp 119–120 °C.

2-Amino-5-chloro-4-methoxypyridine-3-carbonitrile (70). A mixture of **69** (1.50 g, 10.0 mmol) and NCS (2.00 g, 14.9 mmol) in AcOH (30 mL) was heated at 50 °C for 14 h and concentrated. The residue was dissolved in hot AcOEt and THF (ca 10:1, v/v), and the mixture was alkalized with aqueous NaOH. The organic layer was separated and washed sequentially

with water and brine, dried over MgSO_4 , and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 50% AcOEt in hexane) to yield the title compound (1.32 g, 72%) as a pale brown powder. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 4.28 (3H, s), 5.28 (2H, br. s), 8.07 (1H, s). Mp 170–172 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}$: C, 45.79; H, 3.29; N, 22.89. Found: C, 45.86; H, 3.22; N, 22.69.

2-Amino-5-chloro-4-methoxypyridine-3-carboxamide (71). A mixture of **70** (1.18 g, 6.27 mmol) in conc. H_2SO_4 (11 mL) was heated at 100 °C for 1 h and poured into ice. The mixture was alkalized with 8 M NaOH (ca. 40 mL) and extracted with AcOEt and CH_3CN . The extract was washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated in vacuo. The resulting solid was collected and washed with $i\text{Pr}_2\text{O}$ to yield the title compound (1.10 g, 87%) as a white powder. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.97 (3H, s), 5.77 (1H, br. s), 6.78 (2H, br. s), 7.65 (1H, br. s), 8.09 (1H, br. s). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 61.2, 107.4, 111.3, 149.1, 158.4, 160.4, 166.6. Mp 174–176 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_2$: C, 41.70; H, 4.00; N, 20.84. Found: C, 41.74; H, 3.85; N, 20.79.

2-Amino-5-chloro-1-[5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl]-4-oxo-1,4-dihydropyridine-3-carboxamide (61a). A mixture of **71** (50.0 mg, 0.248 mmol) and **68b** (59.3 mg, 0.248 mmol), LiBr (43.1 mg, 0.496 mmol) and Et_3N (50.2 mg, 0.496 mmol) in DMA (1 mL) was stirred at 100 °C for 14 h. The resulting mixture was poured into water and AcOEt. The separated

aqueous phase was extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with water and then brine, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. The residue was purified by NH silica gel column chromatography (eluted with 50%–100% AcOEt in hexane). Crystallization of the residue from DMSO and H₂O yielded the title compound (51.2 mg, 53%) as a colorless solid. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.39 (3 H, s), 5.54 (2 H, s), 6.76 (1 H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.42 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz), 7.74 (1 H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 8.04 (1 H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.06 (1 H, s), 9.13 (2 H, br. s), 10.30 (1 H, d, *J* = 5.0 Hz). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 44.2, 51.1, 96.1, 118.3, 125.5, 128.6, 132.5, 136.4, 136.6, 136.9, 139.1, 156.2, 170.3, 171.4. Mp 294–296 °C. Anal. Calcd for C₁₄H₁₃Cl₂N₃O₄S: C, 43.09; H, 3.36; N, 10.77. Found: C, 43.18; H, 3.38; N, 10.58. LC–MS (ESI) *m/z*: 390.1 [M+H⁺–(HCl)].

5-Chloro-2-((5-chloro-2-(methylsulfonyl)benzyl)amino)-4-oxo-1,4-dihydropyridine-3-carboxamide (72). A mixture of **71** (38.4 mg, 0.190 mmol) and **68a** (54.0 mg, 0.190 mmol) in DMF (0.500 mL) was stirred at 100 °C for 4 h. Then, aqueous NaHCO₃ was added to the mixture, which was extracted with AcOEt, washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluted with 50%–100% AcOEt in hexane) to produce a mixture of **61a** and **72** (23.0 mg, 31%) as a colorless solid. Part of the residue (15.0 mg) was purified using preparative HPLC (Ascentis Phenyl column, eluted with H₂O in CH₃CN containing 5 mM ammonium acetate). The desired

fraction was neutralized with aqueous NaHCO₃ and extracted with AcOEt. The organic layer was separated, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo to yield **72** (6.00 mg, 8%) as a colorless solid. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.31 (3H, s), 4.96 (2 H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.30 (1 H, br. s), 7.54 (1 H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.62 (1 H, s), 7.71 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 7.99 (1 H, d, *J* = 8.4 Hz), 10.29 (1 H, br. s), 11.15 (1 H, br. s), 11.30 (1 H, br. s). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 42.1, 44.1, 96.0, 117.9, 128.3, 128.3, 131.9, 131.9, 136.9, 139.0, 139.8, 154.7, 170.6, 171.9. Mp 243–245 °C. LC–MS (ESI) *m/z*: 390.1 [M+H⁺–(HCl)].

Determination of HPLC yield

The HPLC grade CH₃CN and water were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. A standard solution of **61a** containing an equivalent amount of 1-phenylethanol as the internal standard (IS) was prepared at a concentration of 0.5 mg/mL of **61a** in water/CH₃CN (1/1, v/v). A solution of the IS was similarly prepared at a concentration of 100 mg/mL in DMSO.

Additive(s) were introduced to a mixture of **71** (50.0 mg, 0.250 mmol) and **68b** (59.0 mg, 0.250 mmol) in each solvent evaluated (1 mL), the resulting mixture was stirred for 14 h under each of the described conditions, and then the IS solution (1 mL) was added. After dilution (1:250) with water/CH₃CN (1/1, v/v), 10 μ L of the diluted sample was injected into the

analytical column. The HPLC analyses were performed using a Waters Alliance HPLC system (model e2695) using an isocratic solvent system consisting of CH₃CN and 0.05 M ammonium acetate buffer (35/65) at a flow rate of 1.0 mL/min on an Ascentis Phenyl column (4.60× 250 mm, 5-μm) at 30 °C with UV detection at 220 nm. The HPLC yield of each reaction mixture was determined by comparing the ratio of the peak areas of **61a** and 1-phenylethanol in the sample solution with that in the standard solution, defined as a 100% yield.

References

- (44) (a) Yale, H. L.; Bristol, J. 1-Aralkyl-2(1H)-pyridinimines and their derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12*, 1027–1029. (b) Liebscher, J.; Feist, K. Synthesis of imidazoles by reaction of *N*-benzylated amidines with carboxylic acid derivatives. *J. Prakt. Chem.* **1988**, *330*, 175–181. (c) Sharma, S. Some new 1-benzyl-1,2-dihydro-2-pyridylidenamino, dichlorophosphine. *J. Indian Chem. Soc.* **2004**, *81*, 602–605. (d) Zheng, Y.; Chen, J.; Huang, D.; Liu, X.; Yang, L.; Ni, C. Syntheses and antibacterial properties of substituted benzyl pyridine quaternary ammonium salts. *Huaxue Yanjiu.* **2009**, *20*, 26–28. (e) Maity, A.; Mondal, S.; Paira, R.; Hazra, A.; Naskar, S.; Sahu, K. B.; Saha, P.; Banerjee, S.; Mondal, N. B. A novel approach for the one-pot synthesis of linear and angular fused quinazolinones. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3033–3037. (f) Muthukumar, C.; Nallub, M.; Arunachalama, T.; Subramaniana, M.; Balamurugan, C. Synthesis, characterization and biological evaluation of allyl, benzyl and 4-nitrobenzyl derivatives of aminopyridinium bromides. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2012**, *51*, 388–392.
- (45) International Union of Pure and Applied Chemistry. Solubility data series; vol. 11 ISSN 0191-5622.

総括

筆者は過活動膀胱治療薬の開発を目的に選択的アドレナリン α_{1D} 拮抗薬の研究を行った。まず、社内ライブラリの HTS を行い、高いサブタイプ選択性と活性を有し、これまでに報告されていた α_1 受容体拮抗薬とは化学構造の全く異なるイミノピリジン誘導体 **1** を見出した。化合物 **1** の α_{1D} 結合活性を向上させるため SAR 検討を実施し、リード化合物の 3-クロロベンジル誘導体 **5m** へと導いた。しかし、化合物 **5m** は hERG チャンネル阻害作用を示したため、hERG 阻害作用低減を目的にドッキングモデルを作成し、更なる最適化検討を実施した。hERG チャンネルとの疎水性相互作用を回避することを目的に、イミノピリジン環 1 位のベンジル位へのメチル基の導入および末端フェニル基上への極性基の導入を行った結果、hERG 阻害作用を低減させることに成功した。その過程において、高いサブタイプ選択性を持ち、優れた薬物動態と *in vitro* および *in vivo* における頻尿モデルに対して効果を示した化合物 **5u** を見出した。選択的アドレナリン α_{1D} 拮抗薬を *in vivo* で評価し、薬理作用を検証した初めての例である。

次に、既存の α_1 拮抗薬の中でタムスロシンや化合物 **A** などが有する共通構造のフェノキシエチルアミン骨格に着目し、共通構造を有する社内ライブラリを抽出した結果、高いサブタイプ選択性を有する化合物 **25** を見出した。化合物 **25** が高いサブタイプ選択性を保持したまま活性を向上させるため、ベンジルアミノ基の SAR 検討を実施した。よりドラッグライクな化合物へと導くべく LLE を指標として最適化を行った結果、活性およびサブタイプ選択性発現に重要な部分構造を明らかにした。まず、フェノキシエチルアミノ基と末端フェニル基との間のリンカーを適切な長さに調節することがサブタイプ選択性を保持するために重要であることを見出した。続いて、活性向上を指向してスルホニル基の立体配座について検討を実施した。その結果、スルホニル基を固定化したチオクロメン骨格を有する誘導体が、高い結合活性および膀胱収縮抑制作用を示す

ことを見出した。更なる活性向上を期待してチオクロメン環上へ置換基を導入した結果、先述した化合物 **5u** と同等の高いサブタイプ選択性と活性を有する化合物(*S*)-**59** を創出するに至った。

以上 2 つの異なる戦略を用いてリード化合物を創出する方法により、最適化合物 **5u** と(*S*)-**59** を見出すことに成功した。この中で、よりも優れたプロファイルを示した化合物 **5u** は、臨床候補化合物 TAK-259 として更なる精査試験を実施し、臨床段階へと進めるため各種試験を実施した。その過程でサルおよびヒト特異的な代謝物が確認され、その化学構造の解明と毒性プロファイルを評価するため、サルの尿から単離・精製を行った。NMR 解析から、その化学構造を明らかにし、その生物評価とともに毒性プロファイルを解明するため、効率的な合成ルートの探索を実施した。その結果、DMA 溶媒中臭化リチウムとトリエチルアミン存在下、2-アミノピリジン **71** と塩化ベンジル **68b** を反応させる条件が最も高い収率を示すことを明らかにした。本検討は、これまで報告例の少ない 2-アミノ-4-メトキシピリジンのアルキル化反応に対する位置選択性の詳細を検討した例であり、合成反応における新たな知見である。さらに代謝物 **61a** は、いずれの α_1 受容体サブタイプに対しても親和性が低く、毒性プロファイルに影響を与えないことを明らかにした。

本研究における成果は、選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬として新規構造となるイミノピリジン誘導体とともに、サブタイプ選択性の高いフェノキシエチルアミン誘導体を見出した初めての報告例である。この成果は、選択的アドレナリン α_{1D} 受容体拮抗薬が、過活動膀胱に対する新たな治療手段となりうるかを検証できる有用な知見となる。残念ながら TAK-259 は、臨床試験第一相において当初設定したクライテリアを満たさなかったため、開発を中止している。今後、 α_{1D} 受容体拮抗薬に関して更なる研究が進み、新たな治療手段となる薬剤が開発されることを期待したい。

謝辞

本論文の発表および作成にあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 土井隆行先生に深く感謝いたします。また、本論文の審査にあたり、ご指導ならびにご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 岩渕好治先生、ならびに東北大学大学院薬学研究科教授 徳山英利先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました Axcelead Drug Discovery Partners 代表取締役社長 池浦義典博士、元武田薬品工業 医薬研究本部 化学研究所所長 石原雄二博士に深謝申し上げます。

本研究は終始、武田薬品工業 ニューロサイエンス創薬ユニット リサーチマネージャー 吉田雅都博士、Cardurion Pharma 主席研究員 白井淳也氏のご指導の下行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言とご指導を頂きました武田薬品工業 ニューロサイエンス創薬ユニット 主任研究員 古川英紀氏、薬物安全性研究所 主任研究員 須崎智彦博士、Axcelead Drug Discovery Partners 研究本部 主任研究員 佐藤歩氏、小原康久博士、前崎博信博士、原実希氏、Chromajeon 代表取締役社長 三輪勝彦氏に深謝致します。

化合物の合成や分子設計において多大なご協力と有益なご助言を頂きました Chordia Therapeutics シニアディレクター 今井友美博士、元武田薬品工業 医薬研究本部 主任研究員 多田憲生氏、亀岡長子氏に深謝致します。

本研究の薬理試験をご担当頂きました武田薬品工業 医薬研究本部 主席部員 加茂泉博士、アーサムセラピューテックス 代表取締役 長袋洋博士、元武田薬品工業 医薬研究本部 岡部裕一氏、主任研究員 今井重光氏、犀川礼子氏に深謝致します。

本研究の化合物スクリーニングをご担当頂きました Seedsupply 主任研究員 久野晴彦博士に深謝致します。

本研究の薬物動態試験をご担当頂きました武田薬品工業 薬物動態研究所 主任研究員 藤田央氏、宮本真紀氏に深謝致します。

本論文の作成に際して、有益なご助言とご指導を頂きました武田薬品工業 ニューロサイエンス創薬ユニット リサーチマネージャー 谷口孝彦博士、AGC 基盤技術開発室 マネージャー 藤本卓也博士、Axcelead Drug Discovery Partners アドミニストレーション 主席部員 神山圭司博士、武田薬品工業 ニューロサイエンス創薬ユニット ドラッグディスカバリーケミストリー研究所 所長 一川隆史博士に深謝致します。

最後に、本論文の作成に際して、終始温かく応援していただいた妻 坂内佐和子、父 坂内正明、母 坂内トシエに心から感謝致します。